

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below:

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application No. PCT/JP99/05039 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date

February 15, 2001

Full name of the translator

Ikuko AIHARA

Signature of the translator

Ikuko Aihara

Post Office Address

Kitahama TNK Building 7-1, Dosho-machi

1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045,

Japan

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P99-45	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05039	International filing date (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)	Priority date (day/month/year) 17 September 1998 (17.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/11, 15/63, C07K 14/705, 16/28, A61K 38/17, 48/00, C12Q 1/02, 1/68		
Applicant OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 January 2000 (07.01.00)	Date of completion of this report 02 October 2000 (02.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 17-19

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 17-19 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claims 17-19 relate to a method of therapy for humans which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 17-19

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Tony, J.F. et al., "Characterization of Two Novel Ly-6 Genes", J. Immunol. (1993), Vol. 150, No. 12, pages 5379-5390

Document 2: Suzan, F. et al., "Analysis of three distinct Ly6-A-related cDNA sequences isolated from rat kidney", Immunogenetics (1990), Vol. 31, No. 2, pages 104-111

Document 3: JP, 3-48696, A (Toray Industries, Inc.), 1 March, 1991 (01.03.91) (Family: none)

Document 4: T. Graubert et al., "Characterization of the murine and human Ly-6 gene clusters", Blood (1997), Vol. 90, No. 1, part 2, page 145B

Document 5: M. Nosten-Bertrand et al., "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1", Nature (1996), Vol. 379, pages 826-829

Document 6: Thomas, P. et al., "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules", Immunol. Cell. Biol. (1995), Vol. 73, No. 4, pages 277-296

The subject matters of claims 1-16 appear to be novel since they are not described in any of the documents cited in the ISR. In particular, it is not described in any of the documents that Ly6 family proteins participate in such actions as nerve survival and maintenance, neurotization, glia cell activation and cerebral memory formation.

The subject matters of claims 1-16 appear to involve an inventive step in view of the documents cited in the ISR. The documents do not state that Ly6 family proteins participate in such actions as nerve survival and maintenance, neurotization, glia cell activation and cerebral memory formation. On the other hand, the invention of the present application has advantageous effects in that, due to the above, it can be used in research on the differentiation of neurocytes, for activation of neurocytes, and as a remedy for nervous and mental diseases.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

30 March 2000 (30.03.00)

International application No.:

PCT/JP99/05039

Applicant's or agent's file reference:

P99-45

International filing date:

16 September 1999 (16.09.99)

Priority date:

17 September 1998 (17.09.98)

Applicant:

HORIE, Masato et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

07 January 2000 (07.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8T

特 許 協 力 条 約

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 20 OCT 2000	
WIPO	PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P 99-45	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05039	国際出願日 (日.月.年) 16. 09. 99	優先日 (日.月.年) 17. 09. 98
国際特許分類 (IPC) C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28, Int. Cl ⁷ A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68		
出願人 (氏名又は名称) 大塚製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07. 01. 00	国際予備審査報告を作成した日 02. 10. 00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9 5 4 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 17-19

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 17-19 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 17-19 は、ヒトを治療する方法に係る発明であるから、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 17-19 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-16 有
請求の範囲 無

進歩性(I S)

請求の範囲 1-16 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲 1-16 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Tony, J. F. et al. "Characterization of Two Novel Ly-6 Genes" J. Immunol. (1993) 第150巻 第12号 p. 5379-5390

文献2: Suzan, F. et al. "Analysis of three distinct Ly6-A-related cDNA sequences isolated from rat kidney" Immunogenetics (1990) 第31巻 第2号 p. 104-111

文献3: JP, 3-48696, A (東レ株式会社) 1.3月.1991 (01.03.91) (ファミリーなし)

文献4: T. Graubert et al. "Characterization of the murine and human Ly-6 gene clusters" Blood (1997) 第90巻 第1part2号 p. 145B

文献5: M. Nosten-Bertrand et al. "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1" Nature (1996) 第379巻 p. 826-829

文献6: Thomas, P. et al. "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules" Immunol. Cell. Biol. (1995) 第73巻 第4号 p. 277-296

請求の範囲1-16に記載された発明は、国際調査報告で引用された何れの文献にも記載されておらず、新規性を有する。特にLy6ファミリー蛋白質が神経生存維持作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用及び脳における記憶形成作用に関与することは、前記文献にも記載されていない。

請求の範囲1-16に記載された発明は、国際調査報告で引用された何れの文献に対して進歩性を有する。前記文献には、Ly6ファミリー蛋白質が神経生存維持作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用及び脳における記憶形成作用に関与することは記載されておらず、一方、本願発明はそれにより神経細胞の分化の研究、神経細胞の活性化、神経および精神疾患の治療薬として利用可能であるという有利な効果を奏する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP



PC

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 P 9 9 - 4 5	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 5 0 3 9	国際出願日 (日.月.年) 1 6 . 0 9 . 9 9	優先日 (日.月.年) 1 7 . 0 9 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 大塚製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲17-19は、ヒトを治療する方法に係る発明であるから、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICSTファイル (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Masato, H. et al. "Isolation and Characterization of a New Member of the Human Ly6 Gene Family (LY6H)" Genomics (1998, Nov.) 第53巻 p. 365-368	1-16
Y	Tony, J. F. et al. "Characterization of Two Novel Ly-6 Genes" J. Immunol. (1993) 第150巻 第12号 p. 5379-5390	1-16
Y	Suzan, F. et al. "Analysis of three distinct Ly6-A-related cDNA sequences isolated from rat kidney" Immunogenetics (1990) 第31巻 第2号 p. 104-111	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 12. 99

国際調査報告の発送日

14.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
引地 進



4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-48696, A (東レ株式会社) 1. 3月. 1991 (01. 03. 91) (ファミリーなし)	1-16
Y	T. Graubert et al. "Characterization of the murine and human Ly-6 gene clusters" Blood (1997) 第90巻 第1part2号 p. 145B	1-16
Y	M. Nosten-Bertrand et al. "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1" Nature (1996) 第379巻 p. 826-829	1-16
Y	Thomas, P. et al. "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules" Immunol. Cell. Biol. (1995) 第73巻 第4号 p. 277-296	1-16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



09/787360

(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, 15/63, C07K 14/705, 16/28, A61K 38/17, 48/00, C12Q 1/02, 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO00/17345 (43) 国際公開日 2000年3月30日(30.03.00)		
<table border="1"><tr><td data-bbox="126 380 829 1087">(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05039 (22) 国際出願日 1999年9月16日(16.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/263550 1998年9月17日(17.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/J] 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 堀江正人(HORIE, Masato)[JP/J] 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字南261 Tokushima, (JP) 奥富圭一(OKUTOMI, Keiichi)[JP/J] 〒771-0128 徳島県徳島市川内町上別宮北51-1 アルペンロゼ701 Tokushima, (JP) 谷口吉弘(TANIGUCHI, Yoshihiro)[JP/J] 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-1 ラフォーレII 706 Tokushima, (JP)</td><td data-bbox="829 380 1539 1087">(74) 代理人 鈴木幹生(SUZUKI, Mikio)[JP/J] 大淵 豊(OHBUCHI, Yutaka)[JP/J] 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, MX, SG, US, 欧州 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書</td></tr></table>			(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05039 (22) 国際出願日 1999年9月16日(16.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/263550 1998年9月17日(17.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/J] 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 堀江正人(HORIE, Masato)[JP/J] 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字南261 Tokushima, (JP) 奥富圭一(OKUTOMI, Keiichi)[JP/J] 〒771-0128 徳島県徳島市川内町上別宮北51-1 アルペンロゼ701 Tokushima, (JP) 谷口吉弘(TANIGUCHI, Yoshihiro)[JP/J] 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-1 ラフォーレII 706 Tokushima, (JP)	(74) 代理人 鈴木幹生(SUZUKI, Mikio)[JP/J] 大淵 豊(OHBUCHI, Yutaka)[JP/J] 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, MX, SG, US, 欧州 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05039 (22) 国際出願日 1999年9月16日(16.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/263550 1998年9月17日(17.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/J] 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 堀江正人(HORIE, Masato)[JP/J] 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字南261 Tokushima, (JP) 奥富圭一(OKUTOMI, Keiichi)[JP/J] 〒771-0128 徳島県徳島市川内町上別宮北51-1 アルペンロゼ701 Tokushima, (JP) 谷口吉弘(TANIGUCHI, Yoshihiro)[JP/J] 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-1 ラフォーレII 706 Tokushima, (JP)	(74) 代理人 鈴木幹生(SUZUKI, Mikio)[JP/J] 大淵 豊(OHBUCHI, Yutaka)[JP/J] 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, MX, SG, US, 欧州 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書			
(54) Title: LY6H GENE (54) 発明の名称 LY6H遺伝子 (57) Abstract A brain-specific gene useful in treating Alzheimer's disease, etc. which contains a base sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; a fragment thereof; an expression vector containing the gene; a host cell containing the expression vector; an expression product of the gene; an antibody against the same; and remedies and preventives for nerve degeneration diseases, etc.				

(57)要約

本発明は、例えばアルツハイマー病の治療などに有用な脳特異的遺伝子であって、配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子およびその断片、該遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターを含む宿主細胞、該遺伝子発現産物、これに対する抗体、神経変性疾患治療および予防剤などを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EES	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	CDE	グレナダ	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ			TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ			TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

L Y 6 H 遺 伝 子

技 術 分 野

本発明は、特に脳に特異的に強く発現している遺伝子、
5 より詳しくは、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化、活性型免疫細胞の産生抑制、腫瘍治療などに利用されてきているL y 6 ファミリー（後記文献参照）に属する新しい蛋白質をコードする遺伝子に関する。また本発明は、該遺伝子によりコードされる
10 新規な蛋白質およびその特異抗体にも関する。更に本発明は、アルツハイマー病などの神経変性疾患の治療および予防剤などにも関している。

背 景 技 術

L y 6 ファミリーに属する蛋白質は、低分子G P I ア
15 ンカー構造を持ち、マウス15番染色体上にクラスターを構成する細胞表面の糖蛋白質群として同定された

〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84, 1638-1643 (1987)〕。

該L y 6 ファミリーは、骨髓細胞やリンパ球系細胞に特異的に強い発現を示すことから、T細胞の分化や造血
20 幹細胞のマーカーとして利用されている〔Immunol. Cell Biol., 73, 277-296 (1995)〕。その生体内での機能は未だ不明な点が多いが、リンパ球系において高度に発現

の調節がなされていることより、免疫系、とりわけT細胞の分化や機能に重要な役割を果たしていると考えられる。例えばLy6cは、インテグリン依存的な接着によるCD8⁺T細胞のリンパ節への誘導を媒介しているとの報告がある〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 94, 6898-6903 (1997)〕。

また、多くのGPIアンカー蛋白質は、プロテインキナーゼと相互作用することが知られている〔Science, 254, 1016-1019 (1991)〕。例えば、p56lckやp59fynとLy6とが相互作用することからT細胞のシグナルトランスダクションに関与する可能性が示唆されている〔Eur. J. Immunol., 23, 825-831 (1993)〕。Ly6aを欠いたマウスから得られるT細胞は抗原性刺激に対する増殖能が増長されるという報告もなされている〔J. Exp. Med., 186, 705-717 (1997)〕。T細胞のみならず、B細胞の活性化を調節している可能性も示唆されている〔J. Immunol., 144, 2197-2204 (1990)〕。

更に、いくつかのGPIアンカー蛋白質は、リンパ球系および神経系のいずれにも発現し、機能していることが知られている〔Nature, 379, 826-829 (1996); Curr. Biol., 7, 705-708 (1997)〕。Ly6ファミリーでは、Ly6a.2とLy6Eとがいずれにも発現、機能して

いることが報告されている〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA.,
85, 2255-2259 (1996); J. Immunol., 157, 969-973
(1996)〕。

かかる L y 6 ファミリーに属する蛋白質およびこれを
5 コードする遺伝子の生理的役割の解明とそれにより得ら
れる情報は、基礎科学研究の分野はもとより、医薬品分
野においても、血液幹細胞の精製、血液細胞分化の研究、
免疫細胞の活性化、免疫細胞の活性化の抑制、腫瘍の治
療などの面で有用であると考えられる。

10 近年、アルツハイマー病患者において、加齢に伴う脳
の萎縮に比べて、大脳の側頭葉における過剰な萎縮が報
告されており (Jobst, K. A., et al., Lancet, 343, 829-
830 (1994))、この大脳側頭葉部位に影響する遺伝子がア
ルツハイマー病の発症および進展に何らかの関連がある
15 と考えられる。かかる遺伝子が解明できれば、アルツハ
イマー病の治療および予防分野に有効な情報を与えるこ
とができる。

従って、本発明の目的は、斯界で要望される上記情報、
殊に L y 6 ファミリーに属する新規なヒト蛋白質および
20 これをコードする遺伝子を提供することにある。

また本発明の目的は、アルツハイマー病を初めとする
各種神経変性疾患の治療および予防剤を提供することに

ある。

上記目的より、本発明者は、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、該目的に合致する新しい脳-特異的遺伝子の単離、同定に成功すると共に、この新しく単離した遺伝子の発現がアルツハイマー病患者の海馬や嗅内皮質を含む側頭葉において顕著に減少しており、これがアルツハイマー病の発症、進行或いは痴呆などの一因であり、該遺伝子およびその発現産物の利用が、アルツハイマー病治療および予防に有用であることを見出した。本発明は之等の知見に基づいて完成されたものである。

発 明 の 開 示

本発明によれば、以下の（a）または（b）の蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子が提供される。

15 （a）配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

（b）配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用および脳における記憶形成作用から選ばれる少なくとも1種の生理作用を有する蛋白質。

本発明によれば、特に、配列番号：2で示される塩基配列を含む当該遺伝子およびヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

5 また本発明によれば、以下の（a）および（b）のいずれかのポリヌクレオチドからなる遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

（a）配列番号：3で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

10 （b）配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

更に本発明によれば、上記遺伝子を含む遺伝子発現ベクター；該遺伝子発現ベクターを含む宿主細胞；該宿主細胞によって発現される遺伝子発現産物；本発明遺伝子
15 によってコードされる蛋白質；およびこれら遺伝子発現産物乃至蛋白質に結合性を有する抗体が提供される。

更に本発明によれば、上記蛋白質もしくはその同効物または上記遺伝子発現産物を有効成分とし、これを製剤学的担体と共に含む神経変性疾患治療および予防剤、より詳しくは配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質もしくはその同効物または配列番号：2で示される塩基配列を含む遺伝子の全部または一部の発現産物
20

であって且つ神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用および脳における記憶形成作用から選ばれる少なくとも1種の生理作用を有する遺伝子発現産物を有効成分とする上記神経変性疾患治療および予防剤、特に、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病治療および予防剤が提供される。

加えて本発明によれば、配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも20個の連続するポリヌクレオチド配列からなるセンス鎖オリゴヌクレオチド；該センス鎖オリゴヌクレオチドを有効成分とし、これを製剤学的担体と共に含む遺伝子治療剤；および配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも10個の連続するオリゴヌクレオチド配列からなる遺伝子特異的プローブが提供される。

また本発明によれば、上記蛋白質もしくはその同効物または上記遺伝子発現産物を用いる、之等蛋白質乃至遺伝子発現産物に結合するかまたはこれらの活性に影響を与える候補化合物のスクリーニング方法；スクリーニング用キット；およびスクリーニングされた上記化合物が提供される。

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC-IUB

の規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、

- 「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編) および当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「LY6H」と名付けられたPCR産物のDNA配列から演繹されるものを挙げるができる。その塩基配列は、配列番号: 3 に示されるとおりである。

- 10 該LY6H遺伝子は、配列番号: 1 に示される140アミノ酸配列の新規な脳特異的蛋白質(LY6H蛋白質という)をコードする420のオープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAであり、全長854塩基からなっている。

- 15 本発明遺伝子の発現産物であるLY6H蛋白質は、FASTAプログラム(Person W.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988))を利用したGenBank/EMBLデータベースの検索の結果、マウスLy6ファミリー蛋白質[Immunol. Cell Biol., 73, 277-296 (1995)]と高い相同性が認められた。また、遺伝子相互においても高い相同性が認められた。このことから、本発明遺伝子は、新規なヒトのLy6遺伝子と考

えられる。

本発明 L Y 6 H 遺伝子は、ヒト胎児脳 c D N A ライブラリーから無作為に選択した 2 8 0 0 0 以上の c D N A - クローンの配列解析により、脳に特異的に発現する遺伝子として同定された。その染色体上の位置は、R H による染色体マッピング [Hum. Mol. Genet., 5, 339-346 (1996)] の結果、8 q 2 4 . 3 上に位置することが判った。

従って、本発明に係わる遺伝子およびその発現産物の提供によれば、該遺伝子の各種組織での発現の検出や、ヒト L Y 6 H 蛋白質の遺伝子工学的製造およびそれを用いた抗体の作成が可能であり、これらにより、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の活性化やその抑制、腫瘍の治療などが可能となると考えられる。

加えて、本発明に係わる遺伝子発現産物（ポリペプチド）の提供によれば、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、パーキンソン病、脳虚血などの神経変性疾患に対する予防および治療剤を提供することが可能となる。また、本発明に係わる遺伝子のセンス鎖は、遺伝子治療剤として利用することができ、これによって上記神経変性疾患の発症の抑制、進展の抑制などを行うことができる。

更に本発明によれば、本発明遺伝子発現産物（ポリペプチド）に結合するかまたはその活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング方法およびそのスクリーニング用キットが提供でき、これによって、スクリーニングされた該化合物も提供できる。かかるスクリーニング化合物の特定には、本発明遺伝子の発現産物に結合する抗体を利用することができる。

本明細書において、「遺伝子」なる用語は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含する趣旨で用いられている。その長さは何ら制限されるものではない。従って、本発明遺伝子(DNA)には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA（センス鎖）並びに該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）およびそれらの断片のいずれもが含まれる。

本発明遺伝子(DNA)は、またリーダ配列、コード領域、エキソン、イントロンを含むことができる。ポリヌクレオチドには、RNAおよびDNAが包含される。該DNAには、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含まれる。ポリペプチドには、その断片、同族体（ホモログ）、誘導体、変異体が包含される。上記変異体には、

天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加および挿入によって改変されたアミノ酸配列を有する変異体、同じ機能を有する改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。

5 尚、これらアミノ酸配列の改変（変異など）は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を利用して人為的にこれを行うこともできる。

10 上記変異体は、変異のないポリペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものであることができる。また、上記ポリペプチドは、変異体、ホモログなどを含めて、いずれも共通に保存する構造的な特徴があり、
15 本発明遺伝子発現産物の生物活性、例えば神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用を有しているものであることができる。なお、ポリペプチドの相同性は、配列分析ソフトウェア、例えばFASTAによるSWISSPLOTSデータベース
20 の検索によって解析することができる（Clustal, V., Methods Mol. Biol., 25, 307-318 (1994)）。

 上記変異体をコードする遺伝子は、アミノ酸置換につ

いてサイレントまたは保存されている。即ち、塩基配列によってコードされるアミノ酸残基は変らない。

保存的な置換アミノ酸残基、即ち、元のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換しても、元のアミノ酸残基を有するポリペプチドの活性が保存されているであろう置換可能なアミノ酸残基は、各アミノ酸残基（元のアミノ酸残基）に対して以下に示されるとおりである：

元のアミノ酸残基		保存的な置換アミノ酸残基
	Ala	Ser
10	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
15	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	AsnまたはGln
	Ile	LeuまたはVal
	Leu	IleまたはVal
20	Lys	Arg, AlnまたはGlu
	Met	LeuまたはIle
	Phe	Met, LeuまたはTyr

	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	TrpまたはPhe
5	Val	IleまたはLeu

また、システイン残基（Cys）は、これを他のアミノ酸残基、例えばセリン残基（Ser）、アラニン残基（Ala）、バリン残基（Val）などに置換することが可能である。

本発明遺伝子およびその発現産物の提供は、アルツハイマー病、脳虚血、パーキンソン病などの神経変性疾患の解明、把握、診断、予防および治療に極めて有用な情報乃至手段を与える。また、本発明遺伝子は、上記神経変性疾患の処置に利用される本発明遺伝子の発現を誘導する新規薬剤の開発の上でも好適に利用できる。更に、
10 個体或は組織における本発明遺伝子の発現またはその発現産物の検出や、該遺伝子の変異（欠失や点変異）乃至発現異常の検出は、上記神経変性疾患の解明や診断において好適に利用できる。

本発明遺伝子は、具体的には配列番号：1で示される
20 アミノ酸配列からなる蛋白質をコードする配列番号：2の塩基配列を含む遺伝子、例えば配列番号：3で示される塩基配列を有する遺伝子（LY6H遺伝子）として示

されるが、特にこれに限定されない。例えば、本発明遺伝子は、上記特定のアミノ酸配列において一定の改変を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子や、上記特定の
5 アミノ酸配列と一定の相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子や、之等遺伝子の塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列の遺伝子であることができる。

上記特定のアミノ酸配列や塩基配列に対して、一定の相同性とは、例えば、少なくとも70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましく
10 くは97%以上の相同性であることができる。本発明はかかる相同性を有する相同物（遺伝子相同物および蛋白相同物）を包含する。

本発明遺伝子には、また「配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、
15 置換または付加されたアミノ酸配列（改変されたアミノ酸配列）からなるポリペプチドをコードする遺伝子」も包含される。ここで、「アミノ酸の欠失、置換または付加」の程度およびそれらの位置などは、改変されたアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号：1で示されるア
20 ミノ酸配列からなるポリペプチド（LY6H蛋白質）と同様の生物学的機能を有する同効物であれば、特に制限されない。上記「同様の機能」としては、例えば神経生

存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞
活性化作用、脳における記憶形成作用などの生理活性を
例示することができ、「同効物」とは、之等の機能を有-
するものをいう。従ってこの改変されたアミノ酸配列か
5 らなる蛋白質には、配列番号：1で示されるアミノ酸配
列の一部（連続するもの）であって且つ上記該アミノ酸
配列の全部と同様の上記生理活性を有するもの（同効物）
が包含される。また、上記改変されたアミノ酸配列から
なるポリペプチドをコードする遺伝子は、その利用によ
10 って、改変前のアミノ酸配列のポリペプチドをコードす
る本発明遺伝子が検出できるものであってもよい。なお、
上記改変における複数は、通常2以上、数個を意味する
が、これに限定されない。

本発明のLY6H遺伝子の相同物（および該遺伝子産
15 物の相同物）とは、本発明遺伝子（またはその発現産物）
と配列相同性を有し、構造的特徴、遺伝子発現パターン
における共通性、上記したような生物学的機能の類似性
などにより、ひとつの遺伝子ファミリーと認識される一
連の関連遺伝子（およびその発現産物）を意味する。こ
20 れには本発明遺伝子のアレル体（対立遺伝子）も当然含
まれる。

尚、これらアミノ酸配列の改変（変異）などは、天然

において、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）に基づいて人為的に改変することもできる。本発明は、このような改変・変異の原因および手段
5 などを問わず、上記特性を有する全ての改変遺伝子を包含する。

前記アミノ酸配列の改変（変異）のための人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382
10 (1987)；同 100, 468 (1983)；Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984)；続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)〕などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967)；同
15 91, 3350 (1969)；Science, 150, 178 (1968)；Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981)；同 24, 245 (1983)〕およびそれらの組合せ方法などが例示できる。

より具体的には、DNAの合成は、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法による化学合成によることもでき、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上
20 で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるかまたは

適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

本発明遺伝子の具体的態様としては、配列番号：3に示される塩基配列を有する遺伝子を例示できる。この塩基配列中のコーディング領域（配列番号：2に示す配列）は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例を示している。本発明の遺伝子は、かかる特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ、選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる〔Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)〕。

また、本発明遺伝子には、前記のとおり、配列番号：3に示される塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含される。上記相同性は、配列番号：3に示される塩基配列と少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドを言う。かかる相同性を有する遺伝子は、例えば、上記配列番号：3で示される

塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとして特定される。より詳しくは、 $6 \times \text{SSC}$ 中 65°C 一夜の条件または 50% ホルムアミドを含む $4 \times \text{SSC}$ 中 37°C 一夜の条件下で、該配列番号：3に示される塩基配列のDNAとハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子が、上記相同性を有する遺伝子に包含される。ここで、SSCは、標準食塩－クエン酸緩衝液である (standard saline citrate; $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}, 0.015\text{M sodium citrate}$)。

本発明遺伝子は、本発明により開示された本発明遺伝子の具体例についての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。

具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983) など]。

上記において、cDNAの起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞など、特に脳組織が例示される。また、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社（Clontech Lab. Inc.）などより市販されている各種cDNAライブラリーなどを用いることもできる。

本発明の遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAによって産生される蛋白質に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどやこれらの組合せなどを例示できる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAなどが一般的に使用できるが、既に取得された本

発明遺伝子やその断片も良好に利用できる。また、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

- 5 前記プローブとして用いられるヌクレオチド配列は、
配列番号：2に対応する部分ヌクレオチド配列であって、
少なくとも10個の連続した塩基、好ましくは20個の
連続した塩基、より好ましくは30個の連続した塩基、
最も好ましくは50個の連続した塩基を有するものであ
10 ることができる。また、配列番号：2で示されるオリゴ
ヌクレオチド配列を有する陽性クローンそれ自体をプロ
ーブとして用いることもできる。

- 本発明遺伝子の取得に際しては、PCR法〔Science,
230, 1350 (1985)〕によるDNA/RNA増幅法が好適
15 に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNA
が得られ難いような場合には、RACE法〔Rapid ampl
ification of cDNA ends; 実験医学、12(6), 35 (1994)〕、
特に5'-RACE法〔M.A. Frohman, et al., Proc. Nat
l. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)〕などの採用が好
20 適である。

かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマー
は、本発明によって明らかにされた本発明の遺伝子の配

列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などによればよい。

- 5 上記で得られる本発明遺伝子或いは各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)〕やマキサムーギルバート法〔Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)〕などに従って、また簡便には市販のシーケンスキットなどを用いて、その塩基配列を決定することができる。

このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の有無を特異的に検出することができる。

- 15 かかる検出は常法に従って行うことができ、例えばRT-PCR〔Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E. S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)〕によるRNA増幅やノーザンブロッティング解析〔Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)〕、in situ RT-PCR〔Nucl. Acids Res.,

21, 3159-3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーションなどを利用した細胞レベルでの測定、N A S B A 法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350, 91-92 (1991)] およびその他の各種方法を
5 挙げるができる。好適には、R T - P C R による検出法を挙げるができる。

尚、ここでP C R 法を採用する場合に用いられるプライマーとしては、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り、特に制限はなく、本
10 発明遺伝子の配列情報に基いて適宜設定することができる。通常プライマーとして10～35程度のヌクレオチド、好ましくは15～30ヌクレオチド程度の長さを有する本発明遺伝子の部分配列を有するものを挙げることができる。

15 このように、本発明遺伝子には、本発明にかかるL Y 6 H 遺伝子を検出するための特異プライマーおよび／または特異プローブとして使用されるD N A 断片もまた包含される。

当該D N A 断片は、配列番号：2で示される塩基配列
20 のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとして規定することができる。ここで、ストリンジェントな条件としては、プラ

イマーまたはプローブとして用いられる通常の条件を挙げることができる、特に制限はされないが、例えば、前述
5 するような 6 × S S C 中 6 5 ° C 一夜の条件または 5 0 % -
ホルムアミドを含む 4 × S S C 中 3 7 ° C 一夜の条件を例
示することができる。

本発明遺伝子はこれを通常の遺伝子工学的手法に利用
することにより、該遺伝子の発現産物（ポリペプチド）
またはこれを含む蛋白質を容易に大量に、安定して製造
することができる。

10 従って本発明は、本発明遺伝子のコードするアミノ酸
配列のポリペプチド（本発明遺伝子の発現産物）をも提
供するものであり、また該ポリペプチドの製造のための、
例えば本発明遺伝子を含むベクター、該ベクターに
よって形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培養して
15 本発明ポリペプチドを製造する方法などをも提供するも
のである。

本発明ポリペプチドの具体的態様としては、配列番号：
1 で示されるアミノ酸配列のポリペプチド（L Y 6 H 蛋
白質）を挙げることができるが、本発明ポリペプチドに
20 は、該 L Y 6 H 蛋白質のみならず、その相同物も包含さ
れる。該相同物としては、上記配列番号：1 で示される
アミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が欠

失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ L Y 6 H 蛋白質と同様の機能を有するポリペプチドを挙げることができる。具体的には、前記 L Y 6 H 遺伝子の相同物（アレル体を含む L Y 6 H 同等遺伝子）の発現産物を挙げる
5 ことができる。

また、本発明 L Y 6 H 蛋白質の相同物には、配列番号：1 で示されるアミノ酸配列のポリペプチドと同一活性を有する、哺乳動物、例えばウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマなどや、ラット、マウス、ウサギなど
10 のげっ歯類動物の蛋白質も包含される。

本発明ポリペプチドは、本発明により提供される遺伝子の配列情報に基づいて、常法の遺伝子組換え技術〔例えば、*Science*, 224, 1431 (1984) ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 130, 692 (1985) ; *Proc. Natl. Acad. Sci.*,
15 *USA.*, 80, 5990 (1983) など参照〕に従って調製することができる。

該ポリペプチドの製造は、より詳細には、所望の蛋白質をコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換え DNA（発現ベクター）を作成し、これを宿主細胞に導
20 入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することにより行われる。

上記宿主細胞としては、原核生物および真核生物のい

ずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが
広く挙げられ、好適には大腸菌、とりわけエシェリヒア
・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 株に含まれるものを
5 例示できる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、
酵母などの細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの
細胞である C O S 細胞 [Cell, 23: 175 (1981)] やチャ
イニーズ・ハムスター卵巣細胞およびそのジヒドロ葉酸
レダクターゼ欠損株 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA.,
10 77: 4216 (1980)] などが、後者としては、サッカロミセ
ス属酵母細胞などが好適に用いられる。勿論、これらに
限定される訳ではない。

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺
15 伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター
および S D (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、
更に蛋白合成開始に必要な開始コドン (例えば A T G)
を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベ
クターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えば
20 p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p U C 1 2、p U C 1 3
などがよく用いられるが、これらに限定されず既知の各
種のベクターを利用することができる。大腸菌を利用し

た発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、
例えば p G E X - 4 T (Amersham Pharmacia Biotech社)、
p M A L - C 2, p M A 1 - P 2 (New England
Biolabs社)、 p E T 2 1, p E T 2 1 / l a c q
5 (Invitrogen社)、 p B A D / H i s (Invitrogen社)
などを例示できる。

脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとして
は、通常、発現しようとする本発明遺伝子の上流に位置
するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデ
10 ニル化部位および転写終了配列を保有するものが挙げら
れ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。
該発現ベクターの例としては、具体的には、例えば S V
4 0 の初期プロモーターを保有する p S V 2 dhfr [Mol.
Cell. Biol., 1: 854 (1981)] などが例示できる。上記以
15 外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。
動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクター
の市販品としては、例えば p E G F P - N, p E G F P
- C (Clontech社)、 p I N D (Invitrogen社)、
p c D N A 3. 1 / H i s (Invitrogen社) などの動物
20 細胞用ベクターや、 p F a s t B a c H T (G i b c i
B R L 社)、 p A c G H L T (PharMingen社)、
p A c 5 / V 5 - H i s, p M T / V 5 - H i s,

p M T / B i p / V 5 - h i s (以上Invitrogen社) などの昆虫細胞用ベクターなどが挙げられる。

また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する p A M 8 2 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)] などが例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えば p P I C Z (Invitrogen社)、p P I C Z α (Invitrogen社) などが包含される。

10 プロモーターとしても特に限定なく、エッシェリヒア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーターなどを好ましく利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

15 酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどを好適に利用できる。また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、S V 4 0 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモ-

20

ター、SR α プロモーターなどを例示できる。

尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白として発現させるための pGEX (Promega 社) などを例示できる。

また、成熟ポリペプチドのコード配列が宿主細胞からのポリペプチドの発現、分泌を助けるポリヌクレオチド配列としては、分泌配列、リーダ配列が例示でき、細菌宿主に対して融合成熟ポリペプチドの精製に使用されるマーカー配列 (ヘキサヒスチジン・タグ、ヒスチジン・タグ)、哺乳動物細胞の場合はヘマグルチニン (HA) ・タグを例示できる。

所望の組換えDNA (発現ベクター) の宿主細胞への導入法およびこれによる形質転換法としては、特に限定されず、一般的な各種方法を採用することができる。

また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により所望のように設計した遺伝子によりコードされる本発明の目的蛋白質が、形質転換体の細胞内、細胞外または細胞膜上に発現、生産 (蓄積、分泌) される。

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培

養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

かくして得られる本発明の組換え蛋白質（LY6H蛋白質）は、所望により、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作〔「生化学データブック
5 II」、1175-1259 頁、第 1 版第 1 刷、1980 年 6 月 23 日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25(25), 8274 (1986)；Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987) など参照〕により分離、精製できる。

該方法としては、具体的には、通常の再構成処理、蛋白質沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せが
10 例示でき、特に好ましい方法としては、本発明蛋白質に対する特異的な抗体を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィーなどを例示することができる。
15

20 尚、本発明ポリペプチドをコードする所望の遺伝子の設計に際しては、配列番号：2 に示される LY6H 遺伝子の塩基配列を良好に利用することができる。該遺伝子

は、所望により、各アミノ酸残基を示すコドンに適宜選択変更して利用することも可能である。また、L Y 6 H 遺伝子でコードされるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸残基ないしはアミノ酸配列を置換、欠失、付加などにより改変する場合には、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシスなどの前記した各種方法により行うことができる。

本発明ポリペプチドは、また配列番号：1に示すアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法が包含される。

かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていく所謂ステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含し、本発明蛋白質の合成は、そのいずれによってもよい。

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、常法に従うことができ、例えば、アジド法、混合酸無水物法、D C C 法、活性エステル法、酸化還元法、D P P A（ジフェニルホスホリルアジド）法、D C C + 添加物（1 -

ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミドなど)法、ウッドワード法などを例示できる。

- 5 これら各方法に利用できる溶媒も、この種ペプチド縮合反応に使用されることによく知られている一般的なもののから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサ
- 10 ン、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチルなどおよびこれらの混合溶媒などを挙げることができる。

- 尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸乃至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチル
- 15 エステル、第3級ブチルエステルなどの低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルなどのアラ
- ルキルエステルなどとして保護することができる。

- また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばチロシ
- 20 ン残基の水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジロキシカルボニル基、第3級ブチル基などで保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に、

例えばアルギニン残基のグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、p-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基などの適当な保護基により保護することができる。

上記保護基を有するアミノ酸、ペプチドおよび最終的に得られる本発明蛋白質におけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸などを用いる方法などに従って実施することができる。

かくして得られる本発明ポリペプチドは、前記した各種の方法、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、向流分配法などのペプチド化学の分野で汎用される方法に従って、適宜精製を行うことができる。

本発明ポリペプチドは、その特異抗体を作成するための免疫抗原としても好適に利用できる。この免疫抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）およびモノクローナル抗体を取得することができる。

該抗体の製造法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔例えば、続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）など参照〕。

5 例えば、抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ニワトリなどの通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血などもまた常法に従い実施できる。

モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫
10 抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択され、通常
15 マウスやラットなどが有利に用いられている。免疫は、上記抗血清の場合と同様であり、所望により通常のアジュバントなどと併用して行うこともできる。

尚、融合に使用される形質細胞腫細胞としても、特に限定なく、例えば p 3（p3/x63-Ag8）〔Nature, 256:
20 495-497（1975）〕、p 3-U 1〔Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7（1978）〕、N S - 1〔Eur. J. Immunol., 6: 511-519（1976）〕、

M P C - 1 1 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、S P 2 / 0
[Nature, 276: 269-271 (1978)] など、ラットにおける
R 2 1 0 [Nature, 277: 131-133 (1979)] などおよびそ
れらに由来する細胞などの各種の骨髓腫細胞をいずれも
5 使用できる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融
合促進剤、例えばポリエチレングリコール (P E G) や
センダイウイルス (H V J) などの存在下に公知の方法
に準じて行うことができ、所望のハイブリドーマの分離
10 もまた同様に行い得る [Meth. in Enzymol., 73: 3 (198
1); 上記続生化学実験講座など]。

また、目的とする抗体産生株の検索および単一クロー
ン化も常法により実施され、例えば抗体産生株の検索は、
上記の本発明抗原を利用した E L I S A 法 [Meth. in
15 Enzymol., 70: 419-439 (1980)]、プラーク法、スポッ
ト法、凝集反応法、オクテロニー (Ouchterlony) 法、ラ
ジオイムノアッセイなどの一般に抗体の検出に用いられ
ている種々の方法に従い実施することができる。

かくして得られるハイブリドーマからの本発明抗体の
20 採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培
養上清として得る、また、ハイブリドーマをこれと適合
性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得

る方法などにより実施される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの通常の手段により精製することができる。

かくして得られる抗体は、本発明のLY6H蛋白質に結合性を有することによって特徴付けられ、これは、前述したLY6H蛋白質の精製およびその免疫学的手法による測定乃至識別などに有利に利用できる。また該抗体は、本発明遺伝子の発現減少が神経変性疾患であるアルツハイマー病患者の脳側頭葉部位において確認されていることから、LY6H蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングにも利用することができる。本発明はかかる新規な抗体をも提供するものである。

本発明ポリペプチドは、これを有効成分とする医薬品として医薬分野において有用である。従って、本発明は本発明ポリペプチドを有効成分とする医薬組成物をも提供するものである。

本発明ポリペプチドの上記医薬組成物としての有用性は、前記したようにその脳特異的ポリペプチドが有する神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用、脳の記憶形成作用にある。これらの

活性を確認する方法としては、例えば以下の各方法を挙げることができる。

1) 神経細胞生存維持作用

本発明ポリペプチドの神経細胞生存維持作用を測定する方法としては、例えば、SD系ラット胎仔の全脳より海馬を無菌的に取り出し、酵素処理して得られる細胞を10%牛胎児血清を含むDMEM培地を入れたポリリジン（シグマ社）でコーティングした96ウェルプレートに最終的に 2×10^5 細胞/cm²になるように播く。

次いで細胞を24時間培養後、培養液を1% N2添加物（N2 Supplement, ギブコ社製）を含んだDMEMに交換し、有効成分としての本発明ポリペプチドを添加する（本発明群）。また、比較のため、沸騰水浴中で5分間加熱処理した本発明ポリペプチドの添加（沸騰蛋白質群）を行う。

上記で調製した各群の細胞（培養液）を72時間培養後、例えばプロメガ社のセルタイター96ウェル・アッセイシステムを用いてMTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]アッセイにより、本発明ポリペプチドの海馬神経細胞に対する生存維持効果を調べることができる。

また、上記SD系ラット胎仔の全脳より中脳腹側部を

無菌的に取り出し、同様にMTTアッセイにより、本発明ポリペプチドの中脳神経細胞に対する生存維持効果を調べることができる。

2) ドパミン神経細胞生存維持作用

5 本発明ポリペプチドの神経細胞生存維持作用を測定する方法としては、例えば以下の如きドパミン神経細胞の生存維持作用を測定する方法を挙げることができる。即ち、先ず上記1)で調製した各群の細胞(培養液)を7
2時間培養後、PBSに溶解した4%パラホルムアルデ
10 ヒドを用いて15分間室温で放置して固定し、その後1%トリトンX100/PBSを用いて膜を透過させる。

 抗体の非特異的な結合を防ぐために、細胞を10%ヤギ血清を含むPBSで1時間インキュベートし、その後、抗チロシン水酸化酵素ポリクロナール抗体(ケミコン社
15 製、PBSで1000倍希釈)を用いて16時間4℃でインキュベートする。抗体液を除いた後、細胞をPBSで洗い、ペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリン(ダコ社製)を加えて室温で1時間インキュベートする。

20 チロシン水酸化酵素陽性細胞の検出は、基質としてジアミノベンチジンをを用いる発色反応の有無により可能である。かくしてチロシン水酸化酵素陽性細胞数を指標と

して、本発明ポリペプチドのドパミン神経細胞の生存維持作用を測定することができる。

3) 神経伸長作用

本発明ポリペプチドの神経伸長作用の測定は、例えば
5 PC12細胞(ATCC寄託番号:CRL1721: Science, 229, 393-395 (1985))を用いて、次の如くして実施できる。即ち、5%熱非働化(56℃、30分)ウマ血清と10%ウシ胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法MEM(D-MEM)培地で継代培養したPC12細胞を、コラーゲン
10 でコートした直径35mmプラスチックペトリ皿に6 x 10⁴細胞/3ml培地の濃度で移植し、移植2日目に種々の濃度の本発明ポリペプチド、神経成長因子(NGF: 和光純薬社製)およびFCSの各々を含むD-MEMに交換し、それらのそれぞれについて培養を続け、3日目の
15 細胞の形態変化を位相差顕微鏡により観察する。かくして神経線維様突起の形成が観察されるか或いは神経線維様突起の形成が促進されるかをコントロールと対比することによって、本発明ポリペプチドの神経伸長作用を評価することができる。

20 4) グリア細胞活性化作用

グリア細胞活性化作用は、クニス(Kniss)らやボクラー(Bogler)らの方法に準じて、例えばFGFによるグリア

細胞の活性化に本発明ポリペプチドが与える影響を測定することによって、評価することができる (Kniss, D. A, and Burry, R. W., Brain Res., 439, 281-288 (1988):
Bogler, O., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 87
5 (16), 6368-6372 (1990))。

5) 脳の記憶形成作用

脳の記憶形成作用は、例えばモーリスの水迷路実験 (Morris, R. G. M., J. Neurosci. Meth., 11, 47-60 (1984)) の方法に準じて測定できる。

10 また、例えば変異ベータアミロイド前駆蛋白質遺伝子または変異プレセニリン1遺伝子トランスジェニックマウス (Nature, 373, 523-527 (1995): Nature Med., 5, 560-564 (1999)) などのアルツハイマー病モデル動物に、

15 L Y 6 H 蛋白質或いはスクリーニングによって得られる L Y 6 H 蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニストを投与し、症状の進行度或いは神経変性の程度を非投与群と比較することができる。

また、ヒト脳側頭葉で遺伝子を発現 (遺伝子治療) させるためには、アデノウイルスベクターなど (Straus, E. S., Plenum Press New York, 451-496 (1984), Setoguchi, Y., et al., Blood, 84, 2953-2964 (1994)) を用いる。

20 即ち、アデノウイルスベクターに本発明遺伝子を組み込

み、幹細胞中で培養後、脳側頭葉に直接投与または末梢より静脈内投与して、アルツハイマー性の痴呆症またはアルツハイマー病の改善が得られるか、進展が抑制されるかを判定することなどが考えられる。

- 5 本発明医薬組成物において、有効成分とするポリペプチドには、その医薬的に許容される塩もまた包含される。かかる塩には、当業界で周知の方法により調製される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウムなどの無毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩などが包含される。更に上記塩には、有効成分としての本発明ポリペプチドと適当な有機酸ないし無機酸との反応によって得られる無毒性酸付加塩も包含される。代表的無毒性酸付加塩としては、例えば塩酸塩、塩化水素酸塩、
- 10 臭化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、酢酸塩、蔞酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩
- 15 (トシレート)、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩およびナプシレートなどが例示される。
- 20

本発明医薬組成物には、本発明ポリペプチドを有効成

分として、その薬学的有効量を、適当な無毒性医薬製剤担体ないし希釈剤と共に含有するものが含まれる。

上記医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬製剤担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、
5 充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤或は賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

特に好ましい本発明医薬製剤は、通常の蛋白製剤などに使用され得る各種の添加剤成分、例えば安定化剤、殺
10 菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調製され得る。

上記安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体などを例
15 示できる。これらは必要に応じて、単独でまたは界面活性剤などと組合せて使用することができる。界面活性剤などとの組合せによれば、特に有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。

上記L-アミノ酸としては、特に限定はなく、例えば
20 グリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。

上記糖としても特に限定はなく、例えばグルコース、

マンノース、ガラクトース、果糖などの単糖類、マンニ
トール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコー
ル類、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキス
トラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン
5 硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘
導体を使用できる。

上記界面活性剤としても特に限定はなく、イオン性お
よび非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。具体
例としては、例えばポリオキシエチレングリコールソル
10 ビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキ
ルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪
酸グリセリド系などを使用できる。

セルロース誘導体としても特に限定はなく、例えばメ
チルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチル
15 セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキ
シプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロ
ースナトリウムなどを使用できる。

上記糖類などの添加剤成分の添加量は、通常之等の添
加剤が使用される場合のそれらを参考にして適宜決定で
20 きる。一般に、糖類は有効成分 1 μ g 当り 0.0001
mg 程度以上、好ましくは 0.01 ~ 10 mg 程度の範
囲内から選ばれるのが適当である。界面活性剤は、通常

有効成分 $1 \mu\text{g}$ 当り 0.00001 mg 程度以上、好ましくは $0.0001 \sim 0.01 \text{ mg}$ 程度の範囲から選択されるのが適当である。安定化剤としてのヒト血清アルブミンは、有効成分 $1 \mu\text{g}$ 当り 0.0001 mg 程度以上、好ましくは $0.001 \sim 0.1 \text{ mg}$ 程度の範囲内から選ばれるのが適当である。安定化剤としてのアミノ酸は、有効成分 $1 \mu\text{g}$ 当り $0.001 \sim 10 \text{ mg}$ 程度の範囲から選ばれるのが適当である。また、セルロース誘導体の添加量は、有効成分 $1 \mu\text{g}$ 当り 0.00001 mg 程度以上、好ましくは $0.001 \sim 0.1 \text{ mg}$ 程度の範囲から選ばれるのが適当である。

本発明医薬製剤中に含ませる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約 $0.00001 \sim 70$ 重量%、好ましくは $0.0001 \sim 5$ 重量%程度の範囲内とするのが適当である。

本発明医薬製剤中には、更に例えば緩衝剤、等張化剤、キレート剤なども添加することができる。ここで緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）などを例示できる。等張化剤とし

ては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンなどを例示できる。またキレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。之等の添加量は、通常用いられるそれらの添加量と同様のものとすることができる。

本発明医薬製剤は、溶液製剤として調製使用できる他、これを凍結乾燥化して保存できる状態とすることもできる。かかる凍結乾燥品は、用時水、生理的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製した後に使用することができる。

本発明医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択できる。その代表的なものには、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態や、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態が含まれる。これら各種形態は、投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤などに分類される。上記各形態は、それぞれ、通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

例えば、錠剤の形態に成形するに際しては、前記医薬製剤担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、

- 結晶セルロース、ケイ酸、リン酸カリウムなどの賦形剤；水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤；カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウムなどの崩壊剤；ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリドなどの界面活性剤；白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤；第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤；グリセリン、デンプンなどの保湿剤；デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸などの吸着剤；精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコールなどの滑沢剤などを使用することができる。
- 20 更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠とすることができ、また二重錠ないしは多層錠

とすることもできる。

丸剤の形態に成形するに際しては、医薬製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤；アラビアゴム末、
5 トラガント末、ゼラチン、エタノールなどの結合剤；ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤などを使用できる。

カプセル剤は、常法に従い通常本発明有効成分を上記で例示した各種の医薬製剤担体と混合して、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセルなどに充填して調製できる。

10 経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釈剤、例えば水、を含む医薬的に許容される溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップ、エリキシルなどを包含し、更に湿潤剤、乳剤、懸濁剤などの助剤を含ませることができる。これらは常法に従い調製できる。

15 非経口投与用の液体投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液などへの調製に際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキシ化
20 イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルおよびオリーブ油などの植物油などを使用できる。また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチ

ルなどを配合することもできる。更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤などを添加することもできる。

- 上記各種形態の医薬製剤は常法に従い滅菌処理される。
- 5 該滅菌処理は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させる濾過操作、殺菌剤の配合、照射処理および加熱処理などにより実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

- 10 坐剤や腔投与用製剤の形態に成形するに際しては、医薬製剤担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチンおよび半合成グリセライドなどを使用できる。

- ペースト、クリーム、ゲルなどの軟膏剤の形態に成形
- 15 するに際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイトおよびオリーブ油などの植物油などを使用できる。

- 20 経鼻または舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

尚、本発明医薬製剤中には、必要に応じて着色剤、保

存剤、香料、風味剤、甘味剤などや他の医薬品などを含有させることもできる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに
5 応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤は経口投与され、注射剤は単独でまたはブドウ糖やアミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤は直腸
10 内投与され、経膈剤は膈内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与される。

上記医薬製剤の投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の
15 条件などに応じて広範囲より適宜選択される。一般的には、通常、1日当り患者体重1kg当り、有効成分量が0.01 μ g \sim 10mg程度、好ましくは約0.1 μ g \sim 1mg程度となる量とするのがよい。該製剤は1日に1回投与することもでき、また2回以上、数回に分けて
20 投与することもできる。

また、後記実施例に示されるように、本発明遺伝子は、アルツハイマー病患者の脳側頭葉部位においてその発現

が消失または低下していることから、本発明遺伝子の全部または一部を含有する任意の遺伝子発現ベクターを作成して、該発現ベクターを脳側頭葉組織に導入して、該組織内で本発明遺伝子を強制的に発現させれば、脳側頭

5 葉組織における神経細胞の過剰な萎縮を含む神経変性などが抑制され、結果としてアルツハイマー病の進展などが抑制されることとなる。従って、本発明はかかる神経変性抑制作用を有する遺伝子治療用組成物（遺伝子治療剤）をも提供するものである。

10 更に、本発明によれば、上記遺伝子発現ベクターないしは遺伝子治療用ベクター、該ベクターにより本発明遺伝子を導入した細胞、これらを有効成分とする医薬組成物（遺伝子治療剤）も提供される。

上記遺伝子治療剤を利用した遺伝子治療は、例えば本

15 発明遺伝子の導入、発現用ベクターおよび該ベクターにより本発明遺伝子を導入した細胞から選ばれる少なくとも1種を、神経変性疾患患者の脳神経細胞または脳側頭葉組織部位に、投与することによって実施される。かくして、これら組織における神経変性を抑制し、アルツハ

20 イマー病、アルツハイマー型痴呆症、パーキンソン病、脳虚血などの症状を抑制することができる。

以下、かかる遺伝子治療につき詳述する。尚、以下の

遺伝子治療の実施においては、特記しないかぎり、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学および免疫学の慣用的な方法を用いることができる。これらは、-
例えばマニアティス(Maniatis, T., et al., Molecular
5 cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)),
サムブルック(Sambrook, J., et al., Molecular cloning:
A laboratory manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981)),
10 アウスベル(Ausbel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, (1992)),
グローバー(Glover, D., DNA Cloning, I and II (Oxford Press) (1985)), アナンド(Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic
15 Press (1992)), グスリー(Guthrie, G., et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, (Academic Press) (1991))およびフィンク(Fink, et al., Hum. Gene Ther., 3, 11-19 (1992)に記載されている。

遺伝子治療は、本発明遺伝子の全部または一部を含有
20 する遺伝子治療用導入用ベクターまたは該ベクターにより本発明遺伝子を導入された細胞を用いて実施できる。
該遺伝子治療は、例えばLY6H遺伝子の発現が認めら

れない細胞に、該遺伝子乃至その機能を供給する方法である。かかる遺伝子治療によって、受容細胞／標的細胞周囲の神経細胞の変性が抑制される。

5 本発明遺伝子または該遺伝子の一部は、当該遺伝子を染色体外に維持するようなベクターを用いて細胞に導入することができる。この場合において当該遺伝子は、染色体外の位置から細胞により発現できる。また、L Y 6 H 遺伝子の発現が認められない脳神経の側頭葉部位に遺伝子部分を導入して発現させる場合、当該遺伝子部分は
10 細胞の生存維持或いは非腫瘍的増殖に必要なL Y 6 H 蛋白質の一部分をコードしてもよい。

遺伝子導入用ベクターとしては、後述するように当該分野において既に知られている各種のベクターに本発明遺伝子を導入したものであることができる。

15 遺伝子導入用ベクターの標的細胞への導入は、当該分野において既に知られている各種の細胞にDNAを導入する方法、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈、ウイルス形質導入などに従い容易に実施できる。ここで本発明遺伝子を導入して形質転換した細胞
20 は、脳神経組織の過剰萎縮の抑制を含む脳神経変性抑制のための医薬や治療研究のためのモデル系として利用できる。

前記如く、本発明に従う遺伝子治療によれば、導入された本発明遺伝子やその断片は、脳神経組織またはその周囲組織において該遺伝子の発現産物の量を増加させ、かくして遺伝子発現組織における脳神経組織の萎縮を抑制できる。かかる遺伝子治療は、正常細胞に比して、
5 L Y 6 H 遺伝子の発現または L Y 6 H 蛋白質がなくなっているか、またはそのレベルが減少している脳神経細胞組織の双方において好適に用いられる。

本発明に係わる遺伝子治療は、以下の如くして実施される。即ちまず、例えば、アルツハイマー型痴呆症患者、
10 アルツハイマー病患者の脳側頭葉部に測定位置を固定したコンピュータトモグラム（C T）スキャンにて、脳側頭葉部の萎縮が認められるか否か或いは該萎縮が進行している患者を確認することによって、本発明の遺伝子治療の対象患者をスクリーニングする。
15

次に、本発明遺伝子を発現させるべく標的細胞において、細胞内の L Y 6 H m R N A を作り出し、翻訳を促し、L Y 6 H 遺伝子の発現を促進させる。そのために好ましくは遺伝子の m R N A に対応するセンス・オリゴヌクレ
20 オチドを製造し、該センス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に供給する。上記遺伝子治療によって、L Y 6 H 遺伝子の発現機能を促進する作用を細胞に供給して、受容

細胞／標的細胞における脳の神経変性を抑制することができる。

上記センス・オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子治療によれば、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV由来のベクターにLY6H遺伝子を組み込み、これを標的とする脳神経細胞に感染させてセンス・オリゴヌクレオチドを発現させることにより、所望の脳神経変性抑制効果およびその結果としての神経変性症状の軽減または進展抑制効果を得ることができる。

このように脳神経細胞または組織に、本発明遺伝子のセンス・オリゴヌクレオチドを導入してLY6H蛋白質の発現を増加させる場合、当該センス・オリゴヌクレオチドは、LY6H遺伝子の全長とする必要はなく、該LY6H遺伝子の発現を促進する機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記した改変体であってもよく、また該機能を保持した一部配列からなる遺伝子であってもよい。

かかる組換えおよび染色体外維持の双方のための所望遺伝子の導入のためのベクターは、当該分野において既に知られており、本発明ではかかる既知のベクターのいずれも使用できる。例えば、発現制御エレメントに連結したLY6H遺伝子のセンス・オリゴヌクレオチドのコ

ピーを含み、かつ目的の細胞内で当該センス・オリゴヌクレオチド産物を発現できるウイルスベクターまたはプラスミドベクターを挙げることができる。かかるベクターとして、通常、前述する発現用ベクターを利用することもできるが、好適には、例えば起源ベクターとして、
5 米国特許第 5 2 5 2 4 7 9 号明細書および P C T 国際公開 W O 9 3 / 0 7 2 8 2 号明細書に開示されたベクター（具体的には p W P - 7 A、 p w P - 1 9、 p W U - 1、 p W P - 8 A、 p W P - 2 1 および / または p R S V L
10 など）または p R C / C M V（Invitrogen社製）などを用いて調製されたベクターを挙げることができる。より好ましくは、後述する各種ウイルス・ベクターを挙げることができる。

なお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに
15 使用されるプロモーターとしては、各種疾患の治療対象となる患部組織に固有のものを好適に利用することができる。その具体例としては、例えば、肝臓に対しては、アルブミン、 α -フェトプロテイン、 α 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例
20 示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドラーゼ I、カルシノエンプロゲンの抗原などを例示できる。子宮および胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼ

サイトクローム P 4 5 0、コレステロール側鎖切断
P 4 5 0、17 アルファーヒドロキシラーゼ P 4 5 0 な
どを例示できる。

- 5 前立腺に対しては、前立腺抗原、g p 9 1 - フォックス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。
- 乳房に対しては、e r b - B 2、e r b - B 3、 β -カゼイン、 β -ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示できる。肺に対しては、活性剤蛋白質 C ウログロブリンなどを例示できる。皮膚に対しては、K - 1 4 - ケラチン、
- 10 ヒトケラチン 1 または 6、ロイクリンなどを例示できる。
- 脳に対しては、神経膠繊維質酸性蛋白質、成熟アストロサイト特異蛋白質、ミエリン、チロシンヒドロキシラーゼ、膵臓ヴィリン、グルカゴン、ランゲルハンス島アミロイドポリペプチドなどを例示できる。甲状腺に対しては、
- 15 チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。骨に対しては、 α 1 コラーゲン、オステオカルシン、骨シアログリコプロティンなどを例示できる。腎臓に対してはレニン、肝臓／骨／腎臓アルカリ性ホスフォターゼ、エリスロポエチンなどを、膵臓に対しては、アミラーゼ、
- 20 P A P 1 などを例示できる。

また、センス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの製造において、導入されるセンス・オリゴヌクレオチド

(本発明遺伝子の配列に相応する全部または一部の配列を有するもの)は、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。

- 5 かかるセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入などを始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。なお、
- 10 上記センス・オリゴヌクレオチドで形質転換された細胞は、それ自体、単離された状態で脳神経変性抑制作用を有し、結果として神経変性症状の抑制ないしはその進展抑制のための医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。
- 15 遺伝子治療において、上記センス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターは、患者の脳側頭葉部位またはその周辺部位に局所的にまたは全身的に注射投与することができる。また、幹細胞と共に培養した後に、局所的にまたは全身的に注射投与することができる。この投与により
- 20 上記ベクターを患者の脳神経細胞内に導入することができる。形質導入された遺伝子が各標的細胞の染色体内に恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的に繰

り返すことができる。

本発明の遺伝子治療方法は、前記センス・オリゴヌクレオチド導入用の材料（センス・オリゴヌクレオチド導入用ベクター）を直接体内に投与するインビボ（in vivo）法と、培養幹細胞に遺伝子を導入して培養後、該細胞を患者体内に移植または導入するエキスビボ（ex vivo）法の両方の方法を包含する。また、センス・オリゴヌクレオチドを直接細胞内に導入による遺伝子治療も可能である。

10 本発明遺伝子のセンス・オリゴヌクレオチドを導入する標的細胞は、遺伝子治療（処置）の対象により適宜選択することができる。例えば、該標的細胞としては、脳神経細胞や脳神経組織以外に、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞などを挙げることもできる。

15 上記遺伝子治療におけるセンス・オリゴヌクレオチド導入方法には、ウイルス的導入方法および非ウイルス的導入方法が含まれる。

ウイルス的導入方法としては、例えば、導入されるセンス・オリゴヌクレオチドが、特に正常脳細胞に発現する外来の物質であることに鑑みて、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる方法を挙げることもできる。その他のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベ

クター、H I V (human immunodeficiency virus) ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V, adeno-associated virus)、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ベクター、エプスタイン-
5 バーウイルス (E B V, Epstein-Barr virus) ベクターなどが挙げられる。

以下、具体的なセンス・オリゴヌクレオチド導入用ウイルスベクターの作成法並びに標的細胞または標的組織へのセンス・オリゴヌクレオチド導入法について述べる。

10 レトロウイルスベクター・システムは、ウイルスベクターとヘルパー細胞 (パッケージング細胞) からなっている。ここでヘルパー細胞は、レトロウイルスの構造蛋白質 g a g (ウイルス粒子内の構造蛋白質)、p o l
(逆転写酵素)、e n v (外被蛋白質) などの遺伝子を
15 予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングシグナルやL T R (long terminal repeats)を有しているが、ウイルス複製に必要なg a g、p o l、e n vなどの構造遺伝子を持っていない。パッケージングシグナル
20 はウイルス粒子のアセンブリーの際にタグとなる配列で、選択遺伝子 (n e o, h y g) とクローニングサイトに組込まれた所望の導入用センス・オリゴヌクレオチドが

ウイルス遺伝子の代りに挿入される。ここで高力価のウイルス粒子を得るにはインサートを可能な限り短くし、
 パッケージングシグナルを gag 遺伝子の一部を含め広くとることと、gag 遺伝子の ATG を残さぬようにすることが重要である。

所望のセンス・オリゴヌクレオチドを組み込んだベクター DNA をヘルパー細胞に移入することによって、ヘルパー細胞が作っているウイルス構造蛋白質によりベクターゲノム RNA がパッケージされてウイルス粒子が形成され、分泌される。組換えウイルスとしてのウイルス粒子は、標的細胞に感染した後、ウイルスゲノム RNA から逆転写された DNA が細胞核に組み込まれ、ベクター内に挿入されたセンス遺伝子が発現する。

尚、所望の遺伝子の導入効率を上げる方法として、フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合部位と接合セグメントとを含む断片を用いる方法

[Hananberg, H., et al., Exp. Hemat., 23, 747 (1995)]
 を採用することもできる。

上記レトロウイルスベクター・システムにおいて用いられるベクターとしては、例えばマウスの白血病ウイルスを起源とするレトロウイルス [McLachlin, J. R., et al., Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135

(1990)] を例示することができる。

アデノウイルスベクターを利用する方法につき詳述すれば、該アデノウイルスベクターの作成は、バークネル
〔Berkner, K. L., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158,
5 39-66 (1992)〕、瀬戸口康弘ら〔Setoguchi, Y., et al.,
Blood, 84, 2946-2953 (1994)〕、鐘力江裕美ら〔実験
医学, 12, 28-34 (1994)〕およびケナーら〔Ketner, G.,
et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 6186-6190
(1994)〕の方法に準じて行うことができる。

10 例えば、非増殖性アデノウイルスベクターを作成する
には、まずアデノウイルスの初期遺伝子の E 1 および/
または E 3 遺伝子領域を除去する。次に、目的とする所
望の外来遺伝子発現単位（目的とする導入用センス・オ
リゴヌクレオチド、該センス・オリゴヌクレオチドを転
15 写するためのプロモーター、転写された遺伝子の安定性
を賦与するポリ A から構成）およびアデノウイルスゲノ
ム DNA の一部を含むプラスミドベクターと、アデノウ
イルスゲノムを含むプラスミドとを、例えば 293 細胞
に同時にトランスフェクションする。この 2 者間で相同
20 性組換えを起こさせて、遺伝子発現単位と E 1 とを置換
することにより、所望のセンス・オリゴヌクレオチドを
包含するベクターである非増殖性アデノウイルスベクタ

一を作成することができる。また、コスミドベクターにアデノウイルスゲノムDNAを組み込んで、末端蛋白質を付加した3'側アデノウイルスベクターを作成することもできる。更に組換えアデノウイルスベクターの作成には、YACベクターも利用可能である。

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの製造につき概略すると、AAVはアデノウイルスの培養系に混入してくる小型のウイルスとして発見された。これには、ウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属と、ヘルパーウイルスを必要とするディペンドウイルス属の存在が確認されている。該AAVは宿主域が広く、種々の細胞に感染するありふれたウイルスであり、ウイルスゲノムは大きさが4680塩基の線状一本鎖DNAからなり、その両端の145塩基がITR(inverted terminal repeat)と呼ばれる特徴的な配列を持って存在している。このITRの部分が複製開始点となり、プライマーの役割をなす。更にウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにも、該ITRが必須となる。また、ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、即ち複製や転写をつかさどる調節蛋白質のRepをコードしている。

組換え A A V の作成は、A A V が染色体 D N A に組み込まれる性質を利用して行うことができ、かくして所望の遺伝子導入用ベクターが作成できる。この方法はより詳しくは、まず野生型 A A V の 5' と 3' の両端の I T R
5 を残し、その間に所望の導入用センス・オリゴヌクレオチドを挿入したプラスミド（A A V ベクタープラスミド）を作成する。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は、別のヘルパープラスミドにより供給させる。この両者の間には共通の塩基配
10 列が存在しないようにし、遺伝子組換えによる野生型ウイルスが出現しないようにする必要がある。その後、両者のプラスミドを例えば 2 9 3 細胞へのトランスフェクションにより導入し、さらにヘルパーウイルスとしてアデノウイルス（2 9 3 細胞を用いる場合は非増殖型のも
15 のでもよい）を感染させると、非増殖性の所望の組換え A A V が産生される。続いて、この組換え A A V は核内に存在するので、細胞を凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスを 5 6℃ 加熱により失活させる。更に必要に応じて塩化セシウムを用いる超遠心法により組換え
20 A A V を分離濃縮する。上記のようにして所望の遺伝子導入用の組換え A A V を得ることができる。

E B V ベクターの製造は、例えば清水らの方法に準じ

て行うことができる〔清水則夫、細胞工学、14(3)、280-287 (1995)〕。

本発明に係わるセンス・オリゴヌクレオチドの導入用
E B V ベクターの製造につき概略すると、E B ウイルス
5 (Epstein-Barr virus: EBV) は、1964年にエプスタイン
(Epstein)らによりバーキット (Burkitt) リンパ腫由来
の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルス
である〔Kieff, E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed.
Raven Press, New York, 1990, pp.1889-1920〕。該
10 E B V には細胞をトランスフォームする活性があるので、
遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフ
ォーム活性を欠いたウイルスを調製しなければならない。
これは次の如くして実施できる。

即ち、まず、所望の外来遺伝子を組み込む標的 D N A
15 近傍の E B V ゲノムをクローニングする。そこに外来遺
伝子の D N A 断片と薬剤耐性遺伝子を組み込み、組換えウ
イルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素に
より切り出された組換えウイルス作製用ベクターを
E B V 陽性 A k a t a 細胞にトランスフェクトする。相
20 同組換えにより生じた組換えウイルスは抗表面免疫グロ
ブリン処理によるウイルス産生刺激により野生型
A k a t a E B V とともに回収できる。これを E B V 陰

性 A k a t a 細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型 E B V が共存しない所望の組換えウイルスのみが感染した A k a t a 細胞を得ることができる。さらに組換えウイルス感染 A k a t a 細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

本発明遺伝子治療において、所望遺伝子の標的細胞または標的組織への導入方法には、代表的には以下の２種類の方法が含まれる。

10 その第１法は、治療対象とする患者から標的細胞を採取した後、該細胞を体外で、例えばインターロイキン－２（I L － ２）などの添加の下で培養し、レトロウイルスベクターに含まれる目的とするセンス・オリゴヌクレオチドを導入した後、得られる細胞を再移植する手法（ex vivo 法）である。該方法は例えば欠陥遺伝子によって発生する遺伝子病や癌などの治療に好適である。

第２法は、目的センス・オリゴヌクレオチドを直接患者の体内や脳組織などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法（直接法）である。

20 上記遺伝子治療の第１法は、より詳しくは、例えば次のようにして実施される。即ち、患者から採取した幹細胞などの単核細胞を血液分離装置を用いて単球から分取

- し、分取細胞を I L - 2 の存在下に A I M - V 培地などの適当な培地で 7 2 時間程度培養し、導入すべきセンス・オリゴヌクレオチドを含有するベクターを加える。センス・オリゴヌクレオチドの導入効率をあげるために、
- 5 プロタミン存在下に 3 2 °C で 1 時間、2 5 0 0 回転にて遠心分離した後、3 7 °C で 1 0 % 炭酸ガス条件下で 2 4 時間培養してもよい。この操作を数回繰り返した後、更に I L - 2 存在下に A I M - V 培地などで 4 8 時間培養し、細胞を生理食塩水で洗浄し、生細胞数を算定し、セ
- 10 ンス・オリゴヌクレオチド導入効率を前記 *in situ* P C R や、例えば所望の対象が酵素活性であればその活性の程度を測定することにより、目的センス・オリゴヌクレオチド導入効果を確認する。

- また、培養細胞中の細菌・真菌培養、マイコプラズマ
- 15 の感染の有無、エンドトキシンの検索などの安全度のチェックを行い、安全性を確認した後、予測される効果用量のセンス・オリゴヌクレオチドが導入された培養細胞を患者に点滴静注により戻す。かかる方法を例えば数週間から数カ月間隔で繰り返することにより遺伝子治療が
- 20 施される。

ここでウイルスベクターの投与量は、導入する標的細胞により適宜選択される。通常、ウイルス価として、例

例えば標的細胞 1×10^8 細胞に対して 1×10^3 c f u から 1×10^8 c f u の範囲となる投与量を採用することが好ましい。

上記第 1 法の別法として、目的センス・オリゴヌクレ
5 オチドを含有するレトロウイルスベクターを含有するウ
イルス産生細胞と例えば患者の細胞とを共培養して、目
的とする細胞へセンス・オリゴヌクレオチドを導入する
方法を採用することもできる。

遺伝子治療の第 2 法（直接法）の実施に当たっては、
10 特に体外における予備実験によって、遺伝子導入法によ
って、実際に目的センス・オリゴヌクレオチドが導入さ
れるか否かを、予めベクター遺伝子 c D N A の P C R 法
による検索や in situ P C R 法によって確認するか、或い
は目的センス・オリゴヌクレオチドの導入に基づく所望
15 の治療効果である特異的活性の上昇や標的細胞の増殖増
加や増殖抑制などを確認することが望ましい。また、ウ
イルスベクターを用いる場合は、増殖性レトロウイルス
などの検索を P C R 法で行うか、逆転写酵素活性を測定
するか、或は膜蛋白 (env) 遺伝子を P C R 法でモニターす
20 るなどにより、遺伝子治療に際してセンス・オリゴヌク
レオチド導入による安全性を確認することが重要である
ことはいうまでもない。

本発明遺伝子治療法において、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、パーキンソン病などを対象とする場合は、患者から幹細胞または脳神経細胞を採取後、酵素処理などを施して培養細胞を樹立した後、例えば

5 AAVにて所望のセンス・オリゴヌクレオチドを標的とする脳神経細胞に導入し、G418細胞にてスクリーニングした後、IL-12などの発現量を測定(in vivo)測定し、次いで放射線処理を施行し、患者脳組織内または脳側頭葉部位に接種する神経変性疾患の治療法を一例として挙げるることができる。

10

本発明はまた、本発明センス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターまたは目的センス・オリゴヌクレオチドが導入された細胞を活性成分とし、それらの薬学的有効量を、適当な無毒性医薬担体ないし希釈剤と共に含有する

15 医薬組成物または医薬製剤（遺伝子治療剤）をも提供する。

本発明医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、

20 滑沢剤などの希釈剤ないし賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

本発明医薬製剤の投与単位形態としては、前記した本発明ポリペプチド製剤について詳述したものと同様のものを挙げることができ、治療目的に応じて各種の形態から適宜選択することができる。

5 以下、本発明神経変性疾患の治療および予防方法につき詳述する。

本発明は、過剰および不十分な量のLY6Hポリペプチドが関連するアルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療方法を提供する。LY6H活性が過剰な場合、いくつかの方法を用いることができる。1の方法は、たとえば、リガンド、基質、レセプター、酵素などの結合をブロックすることにより、あるいは2次的シグナルを阻害することにより、LY6Hポリペプチドの機能を阻害するの
10 に効果的な量の前記した阻害化合物（アンタゴニスト）を医薬上許容される担体と共に対象に投与し、そのことにより異常な症状を改善することを含む。もう1つ別の方法において、内在性LY6Hと競争してリガンド、基質、酵素、レセプターなどとの結合能を有する可溶性形態のLY6Hポリペプチドを投与してもよい。かかる競争物質の典型例は、LY6Hポリペプチドのフラグメントを含む。他の方法において、内在性LY6Hと競争し
15
20

てリガンドとの結合能を有する可溶性形態の L Y 6 H ポリペプチドを投与してもよい。かかる競争物質の典型例は、L Y 6 H ポリペプチドのフラグメントを含む。

さらに他の方法において、L Y 6 H 遺伝子発現産物の
5 遺伝子発現遮断法を用いて内在性 L Y 6 H ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害できる。公知のかかる方法は、内部生成した、あるいは別個に投与されたアンチセンス配列の使用を含む（例えば
Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of
10 Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中、O'Connor, J. Neurochem 56 : 560 (1991) を参照）。別法として、遺伝子と共に三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給することもできる（例えば Lee ら、
Nucleic Acids Res., 6 : 3073 (1979) ; Cooney ら、
15 Science, 241 : 456 (1988) ; Dervan ら、Science, 251 : 1360 (1991) 参照）。これらのオリゴマーはそれ自体投与することができ、あるいは関連するオリゴマーをインピボで発現させることもできる。

L Y 6 H およびその活性の過少発現に関連する異常な
20 症状を治療するのに、またいくつかの方法が利用可能である。1の方法は、L Y 6 H を活性化する治療上有効量の化合物（すなわち、前記のアゴニスト）を医薬上許容

される担体とともに対象に投与し、そのことにより異常な状態を改善することを含む。別法として、遺伝子治療を用いて、対象中の関連細胞によるLY6Hの内因的生成を有効ならしめてもよい。例えば、前記のごとく、複製欠損レトロウイルスベクターにて発現するように、本発明のポリヌクレオチドを操作してもよい。ついで、該レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のポリペプチドをコードするRNA含有のレトロウイルスプラスミドベクターでトランスダクションしたパッケージング細胞中に導入して、パッケージング細胞が目的とする遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生成するようにしてもよい。これらのプロデューサー細胞を対象に投与して細胞をインピボで操作し、インピボでポリペプチドを発現するようにしてもよい。遺伝子治療の概説としては、文献

15 [Human Molecular Genetics, T. Strachan and A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) の第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approachesおよびその中の引用文献)が参照される。別法は、治療量のLY6Hポリペプチドを適当な医薬担体と組合わせて投与することである。

20

これらは、リン酸緩衝生理食塩液(pH 7.4)、リンゲル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態など

に調製することもでき、またプロタミンなどの遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調製することもできる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製
5 剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。

上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。
10

一般には、医薬製剤としての所望のセンス・オリゴヌクレオチドを含有するレトロウイルスベクターの投与量は、1日当たり体重1kg当たり、例えばレトロウイルスの力価として約 1×10^3 p f u から 1×10^{15} p f u 程度
15 とするのがよい。

また所望の導入用センス・オリゴヌクレオチドが導入された細胞の場合は、 1×10^4 細胞/body から 1×10^{15} 細胞/body 程度の範囲から選ばれるのが適当である。

該製剤は1日に1回または数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導入効率を高める物質またはこれを含む製剤と併用投与すること
20

ができる。

本発明に従う遺伝子治療を神経変性疾患の治療に適用
する場合は、種々の遺伝子治療を適宜組合わせて行う
(結合遺伝子治療) こともでき、前記した遺伝子治療に、
5 アセチルコリン分解酵素阻害剤などを利用する薬物療法
やリハビリテーション療法などを組合わせて行うことも
できる。さらに本発明遺伝子治療は、その安全性を含め
て、N I Hのガイドラインを参考にして実施することが
できる〔Recombinant DNA Advisory Committee, Human
10 Gene Therapy, 4, 365-389 (1993)〕。

また本発明によれば、L Y 6 H遺伝子の存在を検出
するために、血液または血清のごとき生物学的試料を調製
し、所望により核酸を抽出し、L Y 6 H遺伝子が存在す
る否かについて分析することが可能である。

15 該検出方法は、例えば、本発明遺伝子のDNA断片を
作成し、L Y 6 H遺伝子のスクリーニングおよび／または
はその増幅に用いられるように設計する。より具体的
には、例えばプライクハイブリダイゼーション、コロニー
ハイブリダイゼーション、サザンブロット法、ノーザン
20 ブロット法などにおけるプローブとしての性質を有する
もの、核酸配列をポリメラーゼで増幅するポリメラーゼ
連鎖反応(P C R)により、増幅した本発明遺伝子の全

部または一部のDNA断片を得ることができるためのプローブとしての性質を有するものを作成できる。そのためにはまずLY6H遺伝子と同じ配列を持つプライマーを作成し、これをスクリーニング用プローブとして用い、
5 生物学的試料（核酸試料）と反応させることにより、当該LY6H遺伝子の配列の存在を確認することができる。該核酸試料は、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッキングで調製してもよい。

10 前記スクリーニング方法としては、特にPCR法を用いるのが感度の点から好ましく、該方法は、本発明遺伝子の断片をプライマーとして用いる方法であればとくに制限されず、従来公知の方法(Science, 230, 1350-1354 (1985))や新たに開発された、或いは将来使用される
15 PCR変法(榊 佳之、ほか編、羊土社、実験医学、増刊、8(9) (1990); 蛋白質・核酸・酵素、臨時増刊、共立出版(株)、35(17) (1990))のいずれも利用することが可能である。

プライマーとして使用されるDNA断片は、化学合成
20 したオリゴDNAであり、これらオリゴDNAの合成は自動DNA合成装置など、例えばDNA合成装置(PharmaciaLKB Gene Assembler Plus: ファルマシア社製)を使

用して合成することができる。合成されるプライマー（センスプライマーまたはアンチセンスプライマー）の長さは、約 10 ～ 30 ヌクレオチド程度が好ましく例示できる。上記スクリーニングに用いられるプローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよく、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合によって検出してもよい。適当な標識、並びにプローブおよびリガンドを標識する方法は、本発明の従来技術として知られており、例えばニック・トランスレーション、ランダム・プライミング、キナーゼ処理のような既知の方法によって取り込ませることができる放射性標識、ビオチン、蛍光性基、化学発光基、酵素、抗体などがこれらの技術に包含される。

検出のために用いる PCR 法としては、例えば RT-PCR 法が例示されるが、当該分野で用いられる種々の変法を適応することができる。

また、上記測定方法は、試料中の LY6H 遺伝子の検出のための試薬キットを利用することによって、簡便に実施することができる。

故に、本発明は本発明遺伝子の DNA 断片を含有する LY6H 遺伝子の検出用試薬キットをも提供する。

該試薬キットは、少なくとも配列番号：2 に示される

塩基配列もしくはその相補的塩基配列の一部または全てにハイブリダイズするDNA断片を必須構成成分として含んでいれば、他の成分として、標識剤、PCR法に必要な試薬（例えば、Taq DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、プライマーなど）が含まれていてもよい。

標識剤としては、放射性同位元素または蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられるが、DNA断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてもよい。更に当該試薬キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

更に本発明は、前記測定方法を用いる神経変性疾患の診断方法および該方法に用いる診断剤並びに診断用キットをも提供するものである。

また、前記方法を用いることにより、被検試料中から得られたLY6H遺伝子の配列を直接的若しくは間接的に配列決定することにより、野生型LY6H遺伝子と相同性の高い相同物である新たなLY6H遺伝子に関連する関連遺伝子を見出すことができる。

従って、本発明はかかる測定と被検試料中のLY6H遺伝子の配列決定により、被検試料中のヒトLY6H遺

伝子に関連する関連遺伝子のスクリーニング方法をも提供するものである。

また、本発明ヒト L Y 6 H 遺伝子によりコードされる蛋白質（配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペ
5 プチド）または該配列番号：1において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列のポリペプチド或いはこれらの断片を利用し、またこれら各蛋白質に対する抗体を利用すれば、野生型 L Y 6 H および／または変異 L Y 6 H の測定が可能となる。

10 従って、本発明は、野生型 L Y 6 H および／または変異 L Y 6 H の抗体測定法または抗原測定法を提供するものである。該測定法によって脳神経の障害の程度を野生型 L Y 6 H（ポリペプチド）の変化に基づいて検出することも可能である。かかる変化は、この分野における前
15 記慣用技術による L Y 6 H の配列の分析によっても検出でき、更に好ましくは、抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル抗体）を用いて、L Y 6 H ポリペプチド中の相違または L Y 6 H ポリペプチドの有無を検出することによって検出できる。

20 上記野生型および／または変異 L Y 6 H の測定の具体的な例を次に述べる。即ち、L Y 6 H 抗体は、血液・血清などのヒトより採取した生体材料試料含有溶液から L

Y 6 H ポリペプチドを免疫沈降し、かつポリアクリルアミドゲルのウェスタン・ブロットまたはイムノブロット上でL Y 6 H ポリペプチドと反応することができる。また、L Y 6 H 抗体は、免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中のL Y 6 H ポリペプチドを検出することができる。抗体産生技術および精製する技術は当該分野においてよく知られているので、これらの技術を適宜選択することができる。

野生型L Y 6 Hまたはその突然変異体を検出する方法に関連するより好ましい具体例には、モノクローナル抗体および／またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ(E L I S A)、放射線免疫検定法(R I A)、免疫放射線検定法(I R M A)および免疫酵素法(I E M A)が含まれる。

また、本発明はL Y 6 H ポリペプチドに対する結合活性を有する細胞膜画分または細胞表面上に存在するL Y 6 H レセプター乃至L Y 6 H に対するリガンドをも提供することが可能である。L Y 6 H レセプターの取得は、細胞膜画分を含む生体材料試料中において標識したL Y 6 H ポリペプチドをコンジュゲートさせ、結合反応物を抽出・単離、精製し、単離物のアミノ酸配列を特定

することによって達成される。該LY6Hレセプターポリペプチドの取得並びに配列決定は、この分野の当業者にとり自明である。

また本発明は、LY6Hレセプター結合反応物または
5 その結合断片を種々の薬剤のいずれかをスクリーニング
する技術に用いることによって、化合物(LY6Hレセプ
ター反応物：化合物は低分子化合物、高分子化合物、蛋
白質、蛋白質部分断片、抗原、または抗体など言う)をス
クリーニングすることができる。好ましくは、LY6H
10 レセプターを利用する。かかるスクリーニング試験に用
いるLY6Hレセプターポリペプチドまたはその断片は、
固体支持体に付着させるかまたは細胞表面に運ばれてい
る溶液中の遊離物であってもよい。

薬剤スクリーニングの一例としては、例えばLY6H
15 ポリペプチドまたはその断片を発現する組換え蛋白質で
安定して形質転換した原核生物または真核生物の宿主細
胞を、好ましくは競合的結合アッセイにおいて利用する
ことができる。また遊離のまたは固定した形態のかかる
細胞を標準結合アッセイに用いることもできる。より具
20 体的には、LY6Hレセプターポリペプチドまたはその
断片と、試験する物質との間の複合体の形成を測定し、
LY6Hレセプターポリペプチドまたはその断片と

L Y 6 H ポリペプチドまたはその断片との間の複合体の形成が試験する物質によって阻害される程度を検出することによって化合物をスクリーニングすることが可能である。

- 5 かくして、本発明は、当該分野で既知の方法によって、かかる物質とL Y 6 Hレセプターポリペプチドまたはその断片とを接触させ、次いで、該物質とL Y 6 Hレセプターポリペプチドまたはその断片との間の複合体の存在、またはL Y 6 Hレセプターポリペプチドまたはその断片
- 10 とりガンドとの間の複合体の存在について測定する、薬剤のスクリーニング方法を提供することができる。さらに、L Y 6 Hレセプター活性を測定して、かかる物質がL Y 6 Hレセプターを阻害でき、かくして上記定義されたL Y 6 Hの活性、例えば神経細胞の成長を調節できる
- 15 かどうか或いは蛋白-蛋白相互結合の調節または複合体形成能の調節ができるかどうかを判断できる。かかる競合結合アッセイにおいては、より具体的には、L Y 6 Hレセプターポリペプチドまたはその断片を標識する。遊離のL Y 6 Hレセプターポリペプチドまたはその断片を、
- 20 蛋白質：蛋白質複合体で存在するものから分離し、遊離（複合体未形成）標識の量は、各々、試験される因子のL Y 6 Hレセプターに対する結合またはL Y 6 Hレセプ

ター：L Y 6 H ポリペプチド結合の阻害の尺度となる。

L Y 6 H ポリペプチドの小さなペプチド（ペプチド疑似体）をこのように分析し、L Y 6 H レセプター阻害活性を有するものを測定できる。

- 5 本発明において、薬剤スクリーニングのための他の方法は、L Y 6 H レセプターポリペプチドに対して適当な結合親和性を有する化合物についてのスクリーニング法であって、該略すると、多数の異なるペプチド試験化合物をプラスチックのピンまたは他の物質の表面のごとき
- 10 固体支持体上で合成し、次いでペプチド試験化合物をL Y 6 H レセプターポリペプチドと反応させ、洗浄し、次いで既知の方法を用いて反応結合L Y 6 H レセプターポリペプチドを検出する方法を例示できる（P C T 特許公開番号：W O 8 4 - 0 3 5 6 4 号）。精製された
- 15 L Y 6 H レセプターは、直接、前記の薬剤スクリーニング技術で使用するプレート上に被覆することができる。ポリペプチドに対する非-中和抗体を用いて抗体を補足し、L Y 6 H レセプターポリペプチドを固相上に固定することができる。
- 20 さらに本発明は、競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも目的とする。これによれば、L Y 6 H レセプターポリペプチドまたはその断片に対する結合性につき、

LY6Hレセプターポリペプチドに特異的に結合できる中和抗体と試験化合物とを競合させる。抗体による該競合によって、LY6Hレセプターポリペプチドの1またはそれ以上の抗原決定部位を有するいずれのペプチドの存在をも検出することが可能である。

また、薬剤スクリーニングに関し、更なる方法として、本発明のLY6HポリペプチドまたはLY6H遺伝子発現産物は、本発明LY6HポリペプチドまたはLY6H遺伝子発現産物の活性を活性化（アゴニスト）または阻害（アンタゴニストまたは阻害剤という）する化合物のスクリーニングに用いることができる。

本発明のLY6HポリペプチドまたはLY6H遺伝子発現産物を用いて、例えば細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然物の混合物からアゴニストまたはアンタゴニストを同定するのに用いることもできる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは、本発明のLY6Hポリペプチドの天然または修飾基質、リガンド、酵素、レセプターなどであってもよく、あるいは本発明のポリペプチドの構造的または機能的を模倣物であってもよい（Coliganら、Current Protocols in Immunology 1 (2) Chapter 5 (1991) を参照）。

本発明LY6H遺伝子は、イン・サイト・ハイブリダ

ゼーション (in situ hybridization) により、ヒト正常脳の各組織において発現が確認されたが、アルツハイマー病患者で特に大きな障害を受ける海馬や嗅内皮質 (entorhinal cortex) で強い発現が見られ、また、アルツハイマー病患者の海馬や嗅内皮質を含む側頭葉において、その発現の顕著な減少が認められたことより、この病気の発症や進行などに関与している可能性が高いことが判明した。

したがって、この L Y 6 H 蛋白質または L Y 6 H 遺伝子発現産物に対するアゴニストやアンタゴニストは、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療薬および予防薬として期待できる。

上記 L Y 6 H 遺伝子に関連する各種疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニングによって得られる化合物は、本発明蛋白質（本発明遺伝子発現産物）の機能、例えば、中枢神経系などにおける神経生存維持作用、神経伸長作用や神経再生作用、グリア細胞活性化作用、脳における記憶形成作用などの生理活性を促進し、それ故、例えばアルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病などの各種神経変性疾患の治療および予防剤として使用できる。このように、本発明蛋白質（遺

伝子発現産物、その部分ペプチドおよび之等の塩を含む)は、本発明蛋白質の機能を促進する化合物のスクリーニングのための試薬として有用である。

5 本発明は、本発明蛋白質を用いて本発明蛋白質の機能を促進する化合物（以下、本発明蛋白質の機能促進剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法をも提供する。より具体的には、本発明は、（a）（1）本発明蛋白質を神経細胞または神経組織に接触させた場合と（2）本発明蛋白質および試験化合物を神経細胞または神経組
10 織に接触させた場合との比較を行うことを特徴とする本発明蛋白質の機能促進剤のスクリーニング方法、および（b）（1）本発明蛋白質を脊椎動物に投与した場合と（2）本発明蛋白質および試験化合物を脊椎動物に投与した場合との比較を行うことを特徴とする本発明蛋白質
15 の機能促進剤のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法（a）は、より詳しくは（1）と（2）の場合における中枢神経系などにおける神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用などの生理活性を測定して比較する。また、
20 上記スクリーニング方法（b）は、より詳しくは（1）と（2）の場合における脳の記憶形成作用などを測定して比較する。

上記において神経細胞（神経細胞および神経膠細胞）
としては、ニューロblastoma、グリオーマ細胞または
はその雑種細胞（例、N18TG-2、IMR-32、-
GOTO（例、GOTO-P3）、NB1、C6BU-
5 1、U251、KNS42、KNS81、NG108-
15細胞、神経への分化能をもつPC12細胞など）な
どが用いられる。神経組織としては、マウス神経上皮細
胞、ラット海馬初代培養細胞、マウス胎児培養プルキン
エ細胞、マウス後根神経節などが用いられる。試験化合
10 物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合
成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物
組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規
な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよ
い。

15 上記スクリーニング方法（a）を実施するには、本発
明蛋白質（その部分ペプチドまたはその塩を含む）を、
スクリーニングに適した緩衝液に溶解または懸濁するこ
とにより本発明蛋白質の標品を調製する。緩衝液には、
本発明蛋白質と神経細胞・組織との接触を阻害しない緩
20 衝液（例えばpH約4～10、望ましくはpH約6～8）
のリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液など）がいずれも
利用できる。接触時間は、通常約1日～10日、好まし

くは約 7 日～ 10 日である。接触温度は、通常約 37℃
である。本発明蛋白質の中樞神経系などにおける神経生
存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞-
活性化作用は、視覚的神経軸索の伸長の測定、細胞内
5 Ca^{2+} 濃度の変化の測定などの常套手段により測定する
ことができる。

上記 (2) の場合における神経生存維持作用、神経伸
長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用などの生
理活性を、上記 (1) の場合に比べて約 20% 以上、好
10 ましくは約 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上、
さらに好ましくは 70% 以上促進する試験化合物が、本
発明蛋白質の機能促進剤として選択できる。

上記スクリーニング方法 (b) を実施するには、本発
明蛋白質またはこれと試験化合物とを、静脈注射、皮下
15 注射、筋肉注射、経口投与などにより供試動物に投与す
る。本発明蛋白質の投与量は、経口投与の場合、一般に
哺乳動物 (体重 50 kg として) 一匹、一日当たり約
0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、よ
り好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的投与
20 の場合、その 1 回投与量は、投与対象、投与方法など
によっても異なるが、例えば注射剤形態では、通常哺乳動
物 (体重 50 kg として) 一匹、一日当たり約 0.01

～ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ～ 20 mg 程度、
より好ましくは約 0.1 ～ 10 mg 程度を静脈注射によ
り投与するのが好都合である。

供試動物としては、例えばヒト、サル、チンパンジー、
5 マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、
ネコ、イヌなどの哺乳動物のほか、魚類（例えばコイ、
サケ、ニシン、ニジマス、金魚など）などが用いられる。
本発明蛋白質の脳における記憶形成作用は公知の方法、
例えばモーリスの水迷路実験 [Morris, R.G.M., J.
10 Neurosci. Meth., 11, 47-60 (1984)] などに従って測定す
ることができる。例えば上記（2）の場合における記憶
形成作用が上記（1）の場合に比べて、約 20 % 以上、
好ましくは 50 % 以上、より好ましくは 70 % 以上促進
される試験化合物は、本発明蛋白質の機能促進剤として
15 有効である。

また、本発明の別の態様であるスクリーニング用キッ
トは、本発明蛋白質（遺伝子発現産物、その部分ペプチ
ド、それらの塩を含む）を必須の試薬成分として含有す
る。本発明スクリーニング用キットの例としては、次の
20 構成 1 ～ 4 からなるものが挙げられる。

構成 1 : 測定用緩衝液ハanks液、

構成 2 : 蛋白質標品（本発明蛋白質またはその塩）

構成 3 : 神経細胞または神経組織 (前記した神経細胞または神経組織を 10^4 細胞/ウェルでイーグル MEM、ハ
ンクス液などを用いて 24 穴プレートで 5 % 炭酸ガス下、
37 °C で培養したもの) および

5 構成 4 : 観察のための検出用倒立顕微鏡

上記スクリーニング用キットを利用したスクリーニングは以下の如くして実施できる。

[測定法]

試験化合物を加えたウェルの単位視野あたりの神経軸
10 索を伸ばしている細胞数をカウントし、試験化合物を加えていないコントロールウェルの単位視野あたりの神経軸索を伸ばしている細胞数との有意差検定を行う。

さらに本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、
15 上記した試験化合物、例えばペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明蛋白質の機能を促進する化合物である。本発明の蛋白質などの機能を促進する化合物は、それ自体が
20 中枢神経系などにおける神経生存維持作用、神経伸長作用や神経再生作用、グリア細胞活性化作用などの生理活性を示すことによって、本発明の蛋白質などの機能を相

加的にまたは相乗的に促進することもあるし、あるいは、それ自体は該生理活性を示さないが、本発明蛋白質の機能を促進する作用を奏することもある。該化合物の塩としては、生理学的に許容される塩基（例、アルカリ金属）
5 や酸（例、有機酸、無機酸）との塩が挙げられる。とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩あるいは有機酸（例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、
10 酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩が挙げられる。本発明蛋白質の機能を促進する化合物またはその塩は、例えばアルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病などの各種神経変性疾患に対する
15 安全で低毒性な治療および予防剤として有用である。

前記スクリーニング操作は、LY6Hポリペプチドを細胞表面に発現するかまたは本発明蛋白質に応答する細胞の使用を含んでいる。かかる細胞には、哺乳動物、酵母、*Drosophila*または*E. coli*由来の細胞が包含される。
20 ついで、LY6Hポリペプチド（または発現したポリペプチドを有する細胞膜）を発現するかまたはLY6Hポリペプチドに応答する細胞を、試験化合物と接触させて

結合または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。

LY6H活性について、候補化合物と接触させた細胞の能力を接触させない同じ細胞と比較する。

上記アッセイは、候補化合物に直接または間接的に結合した標識を用いて、あるいは標識競争物質との競争を用いるアッセイにおいて、LY6Hポリペプチドを有する細胞への付着を検出することにより実施できる。かくして、候補化合物の結合を簡単に試験することができる。さらに、候補化合物がLY6Hポリペプチドの活性化により発生するシグナルを生じるかどうかを、LY6Hポリペプチドを有する細胞に適した検出系を用いて、これらのアッセイにより試験してもよい。活性化の阻害剤は、一般に、既知アゴニストの存在下でアッセイされ、候補化合物の存在がアゴニストによる活性化に及ぼす作用を観察する。さらに、アッセイは、簡単に、候補化合物とLY6Hポリペプチドを含む溶液を混合して混合物を形成させ、混合物中のLY6H活性を測定し、混合物のLY6H活性を標準と比較する工程を含んでいてもよい。

LY6H蛋白質に結合する低分子化合物（アゴニストやアンタゴニスト）は、BIACORE 2000などを用いるスクリーニングによって得ることができる（Markgren, P. O., et al., Analytical Biochemistry, 265,

340-350(1998))。

また本発明によれば、より活性または安定した形態の
L Y 6 H ポリペプチド誘導体または例えばイン・ビボ -
(in vivo)でL Y 6 H ポリペプチドの機能を高めるかもし
5 くは妨害する薬剤を開発するために、それらが相互作用
する目的の生物学的に活性なポリペプチドまたはその構
造的アナログ、例えばL Y 6 H アゴニスト、L Y 6 H ア
ンタゴニスト、L Y 6 H インヒビターなどを作製するこ
とが可能である。前記構造的アナログは、例えばL Y 6
10 H ポリペプチドと他の蛋白質の複合体の三次元構造をX
線結晶学、コンピューター・モデリングまたはこれらを
組合わせた方法によって決定することができる。また、
構造的アナログの構造に関する情報は、相同性蛋白質の
構造に基づくポリペプチドのモデリングによっても得る
15 ことが可能である。

上記により、活性なまたは安定した形態のL Y 6 H ポ
リペプチド誘導体を得る方法としては、例えばアラニン
・スキャンによって分析することが可能である。該方法
はアミノ酸残基をAlaで置換し、ペプチドの活性に対する
20 その影響を測定する方法でペプチドの各アミノ酸残基を
このように分析し、当該ペプチドの活性や安定性に重要
な領域を決定する方法である。該方法によって、より活

性なまたは安定な L Y 6 H ポリペプチド誘導体を設計することができる。

また機能性アッセイによって選択した標的－特異的抗体を単離し、次いでその結晶構造を解析することも可能である。原則として、このアプローチにより、続く薬剤の設計の基本となるファーマコア (pharmacore) を得る。機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗－イディオタイプ抗体を生成させることによって、化学的または生物学的に生成したペプチドのバンクよりペプチドを同定したり単離したりすることが可能である。故に選択されたペプチドもファーマコアとして作用できると予測される。

かくして、改善された L Y 6 H 活性もしくは安定性または L Y 6 H 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発することができる。

かかる薬剤は、海馬ニューロンの初代培養細胞を用い、その生存維持に対する影響を調べることにより (Japan. J. Pharmacol. 53, 221-227 (1990))、また変異ベータアミロイド前駆蛋白質遺伝子あるいは変異プレセニリン 1 遺伝子のトランスジェニックマウス (Nature, 373, 523-527 (1995); Nature Med., 5, 560-564 (1999)) などのアルツハイマー病モデル動物の神経病変に及ぼす影

響を調べることにより評価できる。

このようにして得られた化合物はアルツハイマー病のみならず、脳梗塞その他の神経変性疾患治療薬としても利用可能である。

- 5 また本発明によれば、L Y 6 H 遺伝子含有ノックアウト・マウス(変異マウス)を作成することによってL Y 6 H 遺伝子配列のどの部位が生体内で上記したような多様な L Y 6 H 活性に影響を与えるのか、即ちL Y 6 H 遺伝子産物、並びに改変L Y 6 H 遺伝子産物が生体内でどのような機能を有するのかを確認することができる。
- 10

該方法は、遺伝子の相同組換え体を利用して、生物の遺伝情報を意図的に修飾する技術であり、マウスの胚性幹細胞(E S 細胞)を用いた方法を例示できる

(Capecchi, M. R., Science, 244, 1288-1292 (1989))。

- 15 尚、上記変異マウスの作製方法はこの分野の当業者にとって既に通常の技術であり、この改変技術(野田哲生編、実験医学, 増刊, 14 (20) (1996)、羊土社)に、ヒト野性型L Y 6 H 遺伝子および変異L Y 6 H 遺伝子を適応して容易に変異マウスを作製し得る。従って前記技術の適応
- 20 により、改善されたL Y 6 H 活性もしくは安定性またはL Y 6 H 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発するこ

とができる。

図面の簡単な説明

第1図は、アルツハイマー病患者脳の各部位における L Y 6 H 遺伝子の発現状況を示すノーザンプロット解析図
5 である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例 1

10 (1) ヒト L Y 6 H 遺伝子のクローニングおよび D N A シークエンシング

ヒト胎児脳より抽出した m R N A をクローンテック社より購入して出発材料とした。上記 m R N A より c D N A を合成し、ベクター λ Z A P I I (ストラタジーン社製) に挿入し、c D N A ライブラリーを構築した
15 (大塚 G E N リサーチ・インスティテュート、大塚製薬株式会社)。インビボ・エキシジョン法 (in vivo excision: Short, J. M., et al., Nucleic Acids Res., 16, 7583-7600 (1988)) によって寒天培地上にヒト遺伝
20 子を含む大腸菌コロニーを形成させ、ランダムにそのコロニーをピックアップし、96 ウエルマイクロプレートにヒト遺伝子を含む大腸菌クローンを登録した。登録さ

れたクローンは、 -80°C にて保存した。

次に登録した各クローンを 1.5 ml の LB 培地で一
昼夜培養し、プラスミド自動抽出装置 P I - 1 0 0 (ク
ラボウ社製) を用いて DNA を抽出精製した。尚、コン
5 タミした大腸菌の RNA は、RNase 処理により分解除去
した。最終的に $30\text{ }\mu\text{l}$ に溶解し、 $2\text{ }\mu\text{l}$ はミニゲルに
よりおおまかに DNA のサイズおよび量をチェックした。
その $7\text{ }\mu\text{l}$ をシーケンス反応に用い、残りの $21\text{ }\mu\text{l}$
は、プラスミド DNA として 4°C に保存した。また、こ
10 の方法は若干のプログラム変更によって後記に示される
F I S H (fluoresence in situ hybridization) のプロ
ーブ用としても使用可能なコスミドを抽出することがで
きる。

続いて T 3、T 7 或は合成オリゴヌクレオチド・プラ
15 イマーを用いるサンガーらのジデオキシターミネーター
法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA.,
74, 5463-5467 (1977)) 或はジデオキシターミネーター
法に PCR 法を加味した方法であるサイクルシーケエン
ス法 (Carothers, A. M., et al., Bio. Techniques, 7,
20 494-499 (1989)) を実施した。之等の方法は少量のプラ
スミド DNA (およそ $0.1 - 0.5\text{ }\mu\text{g}$) をテンプレ
ート (鋳型) として 4 種の塩基を特異的に停止する伸長

反応させる方法である。

シーケンスプライマーとして F I T C (fluorescein isothiocyanate) 蛍光標識したものを使用し、Taq ポリメラーゼにより約 25 サイクル反応させた。蛍光標識した DNA 断片につき、自動 DNA シーケンサー、ALFTM DNA シーケンサー (ファルマシア社製) により cDNA の 5' 末端側から約 400 塩基の配列を決定した。

3' 非翻訳領域は、各遺伝子の異質性 (heterogeneity) が高く、個々の遺伝子を区別するのに適しているので、場合によっては、3' 側のシーケンスも行った。

DNA シーケンサーで得られた膨大な塩基配列情報を、64 ビットのコンピューター DEC 3400 に転送し、コンピューターによるホモロジー解析を行った。該ホモロジー解析は、UWCG の FASTA (Pearson, W. R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988)) によるデータベース (GenBank, EMBL) 検索により行った。

ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーについての上記解析方法は、藤原ら [Fujiwara, T., et al., DNA Res., 2, 107-111 (1991)] に詳述されている。

上記と同様な方法で、構築されたヒト胎児脳 cDNA

ライブラリーから無作為に選択した E S T s (expressed sequence tags: 発現遺伝子断片の部分 D N A 配列) の配列決定を実施した。

5 F A S T A による Gene Bank と E M B L の配列検索の中で、 G E N - 4 2 5 D 0 1 と命名したクローンが、 マウス L y 6 ファミリー蛋白質をコードする遺伝子と高い相同性を示すことを発見した。

テンプレート (鋳型) としてベクター (pBluescript vector: ストラタジーン社製 (Stratagene)) 内に挿入された二本鎖 D N A と、プライマーとしての合成オリゴヌクレオチドとを使用して、サンガーらのジデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって、上記クローンの有する全コード領域を含む c D N A の塩基配列を決定した。

15 上記で得られたクローンの c D N A 配列は、 A B I P R I S M T M 3 7 7 自動 D N A シークエンサーによる配列決定の結果、 4 2 0 塩基の推定アミノ酸翻訳領域を含んでおり、これによってコードされるアミノ酸配列は、 1 4 0 アミノ酸残基を有し、全長 c D N A クローンの核
20 酸配列は、 8 5 4 塩基からなっていた。その全配列は、配列番号 : 3 に示す通りであり、オープン・リーディング・フレームの核酸配列は配列番号 : 2 に、該酸配列で

コードされるアミノ酸の推定アミノ酸配列は配列番号：
1 に示す通りであった。

他の L Y 6 ファミリー蛋白質と本ヒト L Y 6 H とのア-
ミノ酸配列を比較検討し、またアミノ酸翻訳開始領域に
5 保存されている塩基配列 (Kozak, M., J. Biol. Chem.,
266, 19867-19870 (1991)) と該ヒト L Y 6 H 遺伝子の
5' 領域の比較より決定された開始コドンは、配列番号：
3 の塩基配列の 2 番号の A T G トリプレットである 9 9
- 1 0 1 番目に位置していた。また、ポリアデニレーシ
10 ョン・シグナル (A A T A A A) は、同塩基配列番号の
8 3 2 - 8 3 7 番目に位置していた。

(2) ノーザンブロット分析

組織における L Y 6 H の発現プロファイルを調べるた
め、各種のヒト組織を用いたノーザンブロット分析を行
15 った。

ノーザン・ブロット分析には、ヒト M T N (Multiple
-Tissue Northern) ブロット I と II (クローンテック社
製) を使用した。

c D N A 断片は、T 3 と T 7 プロモーター配列のプラ
20 イマー・セットを用い、P C R によって増幅した。

上記 G E N - 4 2 5 D 0 1 c D N A クロンの P C R
増幅産物を [32 P] - d C T P (ランダムプライムド

DNAラベリングキット、ベーリンガーマンハイム社）により標識してプローブとした。

増幅産物を含むプロットをプレハイブリダイズ（条件は製品のプロトコールに従った）し、そしてそれから製品のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションは、65℃で一晩、1 M NaCl / 50 mM トリス HCl (pH 7.5) / 2 × デンハルツ溶液 / 10 % デキストランサルフェート / 10 % SDS 溶液 (100 μg / ml 変性サケ精子 DNA 含有) の溶液で行った。2 × SSC / 0.1 % SDS にて室温下にて2回洗浄後、次いで0.1 × SSC / 0.1 % SDS にて65℃下に40分間で1回洗浄した。フィルターは-70℃下に18時間、X線フィルム(コダック社製)に対して露光した。

ヒト成人組織として、脳 (brain)、膵臓 (Pancreas)、精巣 (testis)、小腸 (Small intestine)、結腸 (Colon)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (prostate)、卵巣 (Ovary)、心臓 (Heart)、臍丸 (Placenta)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、骨格筋 (Skeletal muscle) 腎臓 (Kidney)、脾臓 (Spleen)、胎盤 (Testis) および末梢血白血球 (Peripheral blood leukocyte) を用い

て上記試験を行った結果、L Y 6 Hに相同する約 1 k b の転写体が、脳 (brain)、膵臓 (Pancreas)、精巣 (testis)、小腸 (Small intestine)、結腸 (Colon)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (prostate) および卵巣

5 (Ovary)、特に脳において強く観察された。

(3) F I S Hによるコスミド・クローンと染色体の局在

染色体の整列のための F I S Hは、公知の方法 (Takahashi E., et al., Hum. Genet., 86, 14-16 (1990))
10 に従って、各コスミド DNA の 0. 5 μ g をプローブとして使用して実施した。F I S Hはプロビア 1 0 0 フィルム (フジ社製、I S O 1 0 0) または C C D カメラ・システム (アプライド・イメージング、サイトビジョン社製) によって捕えられた。

15 その結果、ヒト L Y 6 H 遺伝子は、第 8 染色体のバンド q 2 4. 3 上に位置することが判った。即ち G E N - 4 2 5 D 0 1 は、染色体バンド 8 q 2 4. 3 上にマップされた。

L y 6 ファミリーに属する蛋白質に対する抗体は、遺
20 伝子治療のターゲットとなる血液幹細胞の精製 (van de Rijn, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 86, 4634-4638 (1989))、血液細胞の分化の研究 (van de

Rijn, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 86,
4634-4638 (1989); Classon, B. J. and Coverdale, L.,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 5296-5300 (1994))、
免疫細胞の活性化 (Malek, T. R., et al., J. Exp. Med.,
5 164, 709-722 (1986))、活性型免疫細胞の産生抑制
(Haque, A., et al., Immunology, 69, 558-563 (1990))
などに利用されており、また、抗腫瘍効果も認められて
いる (Lu, L., et al., J. Immunol., 142, 719-725
(1989))。本実施例により提供されるヒト L Y 6 H 遺伝
10 子の利用によれば、該遺伝子の各組織での発現の検出や、
ヒト L Y 6 H 蛋白の遺伝子工学的製造およびそれを用い
た抗体の作成が可能となり、これにより、上記のような
血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫細胞の
活性化、免疫細胞の活性化の抑制、腫瘍の治療などが可
15 能となる。

また、脳に強く発現している L Y 6 H は、神経細胞の
分化の研究、神経細胞の活性化、神経および精神疾患の
治療も可能となる。

ヒト L Y 6 H 蛋白質をターゲットとした化合物のスク
20 リーニングも可能となり、かくして得られる化合物には、
抗ヒト L Y 6 H 蛋白抗体と同様の有用性がある。

実施例 2

(1) アルツハイマー病疾患の脳組織におけるノーザン
ブロット分析

ノーザンブロット分析は、実施例 1 (2) に従って実施した。

- 5 アルツハイマー病患者の脳組織における L Y 6 H 遺伝子の発現を調べるために、アルツハイマー病患者脳組織および正常ヒト脳組織を用いたノーザンブロット分析を実施した。

- 10 ノーザンブロット分析は、ヒト正常脳ブロット I I とヒトアルツハイマーブロット I I (いずれもインビトロゲン社製)を用いて、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、橋、視床、脳梁の各種脳組織、正常人とアルツハイマー病患者の脳の各組織における発現を比較した。

その結果を第 1 図に示す。

- 15 実施例 1 で示されたように L Y 6 H 遺伝子は脳において強く発現しているが、本分析の結果、ヒト正常脳の各組織において発現が確認されたが、アルツハイマー病患者で特に大きな障害を受ける海馬や嗅内皮質 (entorhinal cortex) で強い発現が見られ、また、アルツ
20 ハイマー病患者の海馬や嗅内皮質を含む側頭葉において、その発現の顕著な減少が認められたことより、この病気の発症や進行などに関与している可能性が高いことが判

明した。

したがって、L Y 6 H 遺伝子センス鎖、L Y 6 H 遺伝子発現産物およびL Y 6 H 蛋白質は、アルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血、パーキンソン病の治療薬として期待できる。

また、L Y 6 H 蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニストも、アルツハイマー病などの治療薬として期待できる。

実施例 3

10 (1) L Y 6 H 発現ベクターの構築

インビボ・エキシジョン法により得られるL Y 6 H のc D N A をM v l I およびX h o I で切断処理して、約800塩基の断片を得る。この断片は、配列番号：1に示されるL Y 6 H 遺伝子の全コード領域を含んでおり、これを、予めE c o R V およびX h o I で切断したp A c 5. 1 / V 5 - H i s A (Invitrogen社) に挿入して発現ベクター (p A C / L Y 6 H 発現ベクター) を得る。

(2) 本発明有効成分蛋白質の発現と精製

p A C / L Y 6 H 発現ベクターとp C o H Y G R O ベクター (Invitrogen社) のD N A を19 : 1の比率で混合後、リン酸カルシウム法にてショウジョウバエ (Schneider 2)細胞へ導入する。10%牛胎児血清を含む

DES 発現培地 (DES Expression Medium, Invitrogen社) で 48 時間 23℃ にて培養後、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ のハイ
 グロマイシン B (Hygromycin B, Boeringer Mannheim社) を添加し、薬剤耐性細胞株の選別を 2 週間行う。得られ
 5 る安定形質導入細胞株を、 5×10^6 細胞/ ml の細胞濃度、10% 牛胎児血清を含む DES 発現培地
 (Invitrogen社) 20 ml でファルコン 5000
 (Falcon5000) 培養フラスコ (Becton Dickinson社) 20 枚を用いて静置培養を行い、細胞を回収する。リン酸塩
 10 緩衝生理食塩液 (PBS) で 2 回洗浄後、2% 牛血清アルブミン、フォスファチジルイノシトール-特異的ホス
 ホリパーゼ C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PIPLC社) 0.5 単位/ ml を含む
 PBS に懸濁し、37℃ で一時間培養する。この培養上
 15 清より、イオン交換カラム等にて、目的蛋白質を精製することが可能である。

(3) 海馬神経細胞の単離と培養

SD 系ラット 18 日齢胎仔より無菌的に全脳を取り出し海馬を切り分ける。メスで細切後、0.25% トリプ
 20 シン、0.002% DNase I を含む PBS 中で 37℃、20 分間インキュベートして酵素処理する。牛胎児血清を添加し酵素反応を停止させた後、プラスチック製チッ

プを付けたピペットで細胞液を吸い上げて吐き出す操作を3回繰返して、細胞を分散させる。レンズペーパーを2枚重ねたフィルターに細胞液をろ過して消化されなかった組織片を除き、1000rpmで5分間遠心する。

- 5 DME M培地（ギブコ社製）を用いて細胞を洗い、10%牛胎児血清を含むDME M培地を入れたポリLリジン（Sigma社）でコーティングした96ウェルプレートに細胞を最終的に 2×10^5 細胞/cm²になるように播く。

（4）本発明有効成分蛋白質による処理

- 10 上記細胞を24時間培養後、培養液を1%N₂添加物（N₂ Supplement, GIBCO社製）を含むDME Mに交換し、上記（2）の本発明有効成分蛋白質を添加する（本発明群）。

- また比較のため、沸騰水浴中で5分間加熱処理した本
15 発明有効成分蛋白質添加（沸騰蛋白質群）を行う。

（5）海馬神経細胞生存維持評価

- 上記（4）で調製した各群の細胞（培養液）を72時間培養後、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]アッセイにより、本発明
20 有効成分蛋白質の海馬神経細胞に対する生存維持効果を調べることができる。このMTTアッセイには、例えばプロメガ社の「CellTiter 96」アッセイシステムを用い

て実施することもできる。

(6) 中脳神経細胞の単離と培養

S D系ラット 1 4 日齡胎仔より無菌的に全脳を取り出し、中脳腹側部 (ventral midbrain) を切り分ける。メ
5 スで細切後、0. 2 5 %トリプシン、0. 0 0 2 %
D N a s e Iを含むリン酸塩緩衝生理食塩液 (P B S) 中で
3 7 °C、2 0 分間インキュベートして酵素処理する。牛
胎児血清を添加し酵素反応を停止させた後、プラスチック
製チップを付けたピペットで細胞液を吸い上げて吐き
10 出す操作を 3 回繰返して細胞を分散させる。レンズペー
パーを 2 枚重ねたフィルターに細胞液をろ過して、消化
されなかった組織片を除き、1 0 0 0 r p mで 5 分間遠
心する。D M E M / F 1 2 培地 (ギブコ社製) を用いて
細胞を洗い、1 0 %牛胎児血清を含む D M E M / F 1 2
15 培地を入れたポリ L リジンでコーティングした 9 6 ウェ
ルプレートに細胞を最終的に 3×10^5 細胞 / cm^2 にな
るように播く。

(7) 本発明有効成分蛋白質による処理

上記 (6) で調製した細胞を 2 4 時間培養後、培養液
20 を 1 % N_2 添加物 (N_2 Supplement, GIBCO 社製) を含む
D M E M / F 1 2 に交換し、上記 (2) の本発明有効成
分蛋白質を添加する (本発明群)。

また比較のため、沸騰水浴中で5分間加熱処理した本発明有効成分蛋白質添加（沸騰蛋白質群）をも行う。

(8) 中脳神経細胞生存維持評価

上記（7）で調製した各群の細胞（培養液）を72時間培養後、MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]アッセイにより、本発明有効成分蛋白質の中脳神経細胞に対する生存維持効果を調べることができる。このMTTアッセイには、例えばプロメガ社の「Cell Titer 96」アッセイシステムを用いることができる。

(9) ドパミン神経細胞生存維持評価

上記（7）で調製した各群の細胞（培養液）を72時間培養後、PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒドを用いて15分間室温で放置して細胞を固定し、その後1%トリトンX100/PBSを用いて膜を透過させる。

抗体の非特異的な結合を防ぐために、細胞を10%ヤギ血清を含むPBSで1時間インキュベートし、その後、抗チロシン水酸化酵素ポリクロナール抗体（CHEMICON社製、PBSで1000倍希釈）を用いて16時間4℃で細胞をインキュベートする。抗体液を除いた後、細胞をPBSで洗い、ペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリン（DAKO社製）

を加えて室温で1時間インキュベートする。

チロシン水酸化酵素陽性細胞の検出は、基質としてジ
アミノベンチジンを用いる発色反応の有無により可能で
ある。チロシン水酸化酵素陽性細胞数を指標として、ド
5 パミン神経細胞の生存維持を評価できる。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、新規な脳特異的遺伝子およびこれに
よりコードされる蛋白質が提供され、これらの利用によ
れば、血液幹細胞の精製、血液細胞の分化の研究、免疫
10 細胞の活性化、活性型免疫細胞の産生抑制、腫瘍の治療
などに有用な技術が提供される。また、本発明によれば、
脳組織の神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作
用、グリア細胞活性化作用、脳における記憶形成作用な
どの生理活性を有する新規な遺伝子が提供される。

15 本発明遺伝子は、アルツハイマー病患者の脳側頭葉に
おいてその発現が著しく減少していることより、之等の
組織における神経変性を抑制すると考えられ、それ故、
遺伝子治療剤として有用であり、また本発明遺伝子の発
現産物はかかる神経変性疾患に対する予防および治療剤
20 として有用である。

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) または (b) の蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子：

5 (a) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列において1
または複数のアミノ酸が欠失、置換または付加された
アミノ酸配列からなり、且つ神経生存維持作用、神経
伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活性化作用およ
10 び脳における記憶形成作用から選ばれる少なくとも1
種の生理作用を有する蛋白質。

2. 塩基配列が配列番号：2 で示されるものである請求項 1 に記載の遺伝子。

15

3. 以下の (a) および (b) のいずれかのポリヌクレオチドからなる遺伝子：

(a) 配列番号：3 で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

20 (b) 配列番号：3 で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

4. ヒト遺伝子である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の遺伝子。

5 5. 請求項 2 または 3 に記載の遺伝子を含む遺伝子発現ベクター。

6. 請求項 5 に記載の遺伝子発現ベクターを含む宿主細胞。

10

7. 請求項 6 に記載の宿主細胞によって発現される遺伝子発現産物。

8. 請求項 1 に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

15

9. 請求項 7 に記載の遺伝子発現産物または請求項 8 に記載の蛋白質に結合性を有する抗体。

20 10. 配列番号：2 で示される塩基配列を含む遺伝子の全部または一部の発現産物であって且つ神経生存維持作用、神経伸長作用、神経再生作用、グリア細胞活

性化作用および脳における記憶形成作用から選ばれる
少なくとも1種の生理作用を有する遺伝子発現産物。

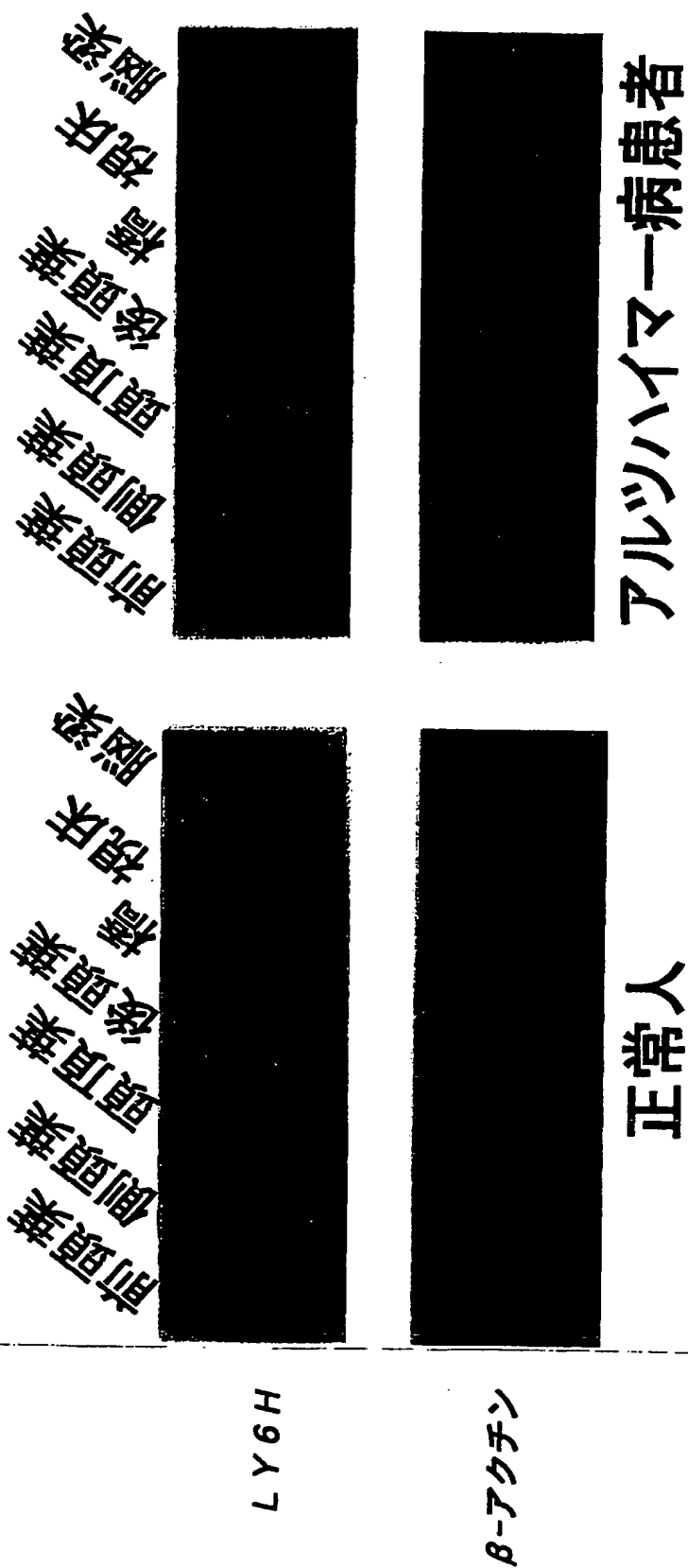
- 1 1. 請求項8に記載の蛋白質またはその一部のアミ
5 ノ酸配列からなる同効蛋白質または請求項10に記載
の遺伝子発現産物を有効成分とし、これを製剤学的担
体と共に含む神経変性疾患治療および予防剤。
- 1 2. 神経変性疾患がアルツハイマー病、アルツハイ
10 マー型痴呆症、脳虚血およびパーキンソン病から選ば
れるものである請求項11に記載の神経変性疾患治療
および予防剤。
- 1 3. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも
15 20個の連続するオリゴヌクレオチド配列からなるセ
ンス鎖オリゴヌクレオチド。
- 1 4. 請求項13に記載のセンス鎖オリゴヌクレオチ
ドを有効成分とし、これを製剤学的担体と共に含む遺
20 伝子治療剤。
- 1 5. 配列番号：2で示される塩基配列の少なくとも

10個の連続するオリゴヌクレオチド配列からなる遺伝子特異的プローブ。

- 5 16. 請求項8に記載の蛋白質またはその一部のアミノ酸配列からなる同効蛋白質または請求項10に記載の遺伝子発現産物を用いることを特徴とする、之等蛋白質または発現産物に結合するかまたは之等の活性に影響を与える候補化合物のスクリーニング方法。
- 10 17. 請求項8に記載の蛋白質またはその一部のアミノ酸配列からなる同効蛋白質または請求項10に記載の遺伝子発現産物の有効量を患者に投与する、神経変性疾患の治療および予防方法。
- 15 18. 神経変性疾患がアルツハイマー病、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血およびパーキンソン病から選ばれるものである請求項17に記載の神経変性疾患の治療および予防方法。
- 20 19. 請求項13に記載のセンス鎖オリゴヌクレオチドの有効量を患者に投与する遺伝子治療方法。

1/1

FIG. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/4

SEQUENCE LISTING

<110> Ostuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> LY6H gene

<130> P99-45

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> human embryonic brain

<400> 1

Met Leu Pro Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val
1 5 10 15
Leu Leu Cys Ser Ala Pro Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr
20 25 30
Leu Thr Thr Asn Ser Ser His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser
35 40 45
Asp Thr Val Cys Ala Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg
50 55 60
Lys Asp His Ser Val Asn Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val
65 70 75 80
Lys Arg His Phe Phe Ser Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly
85 90 95
Ile Leu Lys Val Asp Val Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly
100 105 110
Ala Ala Gly Ala Gly His Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu
115 120 125

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/4

Leu Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Trp Ala Gly Pro

130

135

140

<210> 2

<211> 420

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<400> 2

atgctgcctg cagccatgaa gggccctcggc ctggcgctgc tggccgtcct gctgtgctcg 60
 gcgcccgcic atggcctgtg gtgccaggac tgcaccctga ccaccaactc cagccattgc 120
 accccaaagc agtgccagcc gtccgacacg gtgtgtgcca gtgtccgaat caccgatccc 180
 agcagcagca ggaaggatca ctcggtgaac aagaatgtgt cctcctcctg tgacttcgtt 240
 aagcgacact ttctctcaga ctatctgaig gggtttatta actctgggat cttaaaggctc 300
 gacgtggact gctgcgagaa ggatttgtgc aatggggcgg caggggcagg gcacagcccc 360
 tgggccctgg ccggggggct cctgctcagc ctggggcctg cctcctctg ggctgggccc 420

<210> 3

<211> 854

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<220>

<221> CDS

<222> (99).. (518)

<400> 3

acgccgcccc agccccgagt gcggacaccc ccgggatgct tgcgccccag aggacccgcg 60
 ccccaagccc ccgcgccgcc ccagggccca ccgggagc atg ctg cct gca gcc atg 116

Met Leu Pro Ala Ala Met

1

5

aag ggc ctc ggc ctg gcg ctg ctg gcc gtc ctg ctg tgc tcg gcg ccc 164

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/4

Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val Leu Leu Cys Ser Ala Pro
 10 15 20
 gct cat ggc ctg tgg tgc cag gac tgc acc ctg acc acc aac tcc agc 212
 Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr Leu Thr Thr Asn Ser Ser
 25 30 35
 cat tgc acc cca aag cag tgc cag ccg tcc gac acg gtg tgt gcc agt 260
 His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser Asp Thr Val Cys Ala Ser
 40 45 50
 gtc cga atc acc gat ccc agc agc agc agg aag gat cac tcg gtg aac 308
 Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg Lys Asp His Ser Val Asn
 55 60 65 70
 aag atg tgt gcc tcc tcc tgt gac ttc gtt aag cga cac ttt ttc tca 356
 Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val Lys Arg His Phe Phe Ser
 75 80 85
 gac tat ctg atg ggg ttt att aac tct ggg atc tta aag gtc gac gtg 404
 Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly Ile Leu Lys Val Asp Val
 90 95 100
 gac tgc tgc gag aag gat ttg tgc aat ggg gcg gca ggg gca ggg cac 452
 Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly Ala Ala Gly Ala Gly His
 105 110 115
 agc ccc tgg gcc ctg gcc ggg ggg ctc ctg ctc agc ctg ggg cct gcc 500
 Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu Leu Ser Leu Gly Pro Ala
 120 125 130
 ctc ctc tgg gct ggg ccc tgatgtctcc tccttcccac ggggttctg 548
 Leu Leu Trp Ala Gly Pro
 135 140
 agcttgctcc cctgagccctg tggctgccct ctccccagcc tggcgtggct ggggctgggg 608
 gcagccttgg cccagctccg tggctgtggc ctgtggctct cactcctccc ccgacgtgaa 668
 gccctccctgt ctctccgcca gctctgagtc ccaggcagct ggacatctcc aggaaaccag 728

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/4

gccatctggg caggaggcct ggggatgagg gggggggggg acccccaggt cccggagggg 788
aagtgaagca acagcccagc tggaaggcg tcctctgcgg agaaataaag tcacttttga 848
gtcccg 854

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICST (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Masato, H. et al., "Isolation and Characterization of a New Member of the Human Ly6 Gene Family (LY6H)", Genomics (November, 1998), Vol. 53, pages 365-368	1-16
Y	Tony, J. F. et al., "Characterization of Two Novel Ly-6 Genes", J. Immunol. (1993), Vol.150, No.12, pages 5379-5390	1-16
Y	Suzan, F. et al., "Analysis of three distinct Ly6-A-related cDNA sequences isolated from rat kidney", Immunogenetics (1990), Vol. 31, No. 2, pages 104-111	1-16
Y	JP, 3-48696, A (Toray Industries, Inc.), 01 March, 1991 (01.03.91) (Family: none)	1-16
Y	T. Graubert et al., "Characterization of the murine and human Ly-6 gene clusters", Blood (1997), Vol. 90, No.1 part 2, p. 145B	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 December, 1999 (07.12.99)

Date of mailing of the international search report
14 December, 1999 (14.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. Nosten-Bertrand et al., "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1", <i>Nature</i> (1996), Vol. 379, pages 826-829	1-16
Y	Thomas, P. et al., "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules", <i>Immunol. Cell. Biol.</i> (1995), Vol. 73, No. 4, pages 277-296	1-16 -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05039

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 17-19 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C07K14/705, C07K16/28,
A61K38/17, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICSTファイル (JOIS), Genbank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Masato, H. et al. "Isolation and Characterization of a New Member of the Human Ly6 Gene Family (LY6H)" Genomics (1998, Nov.) 第53巻 p. 365-368	1-16
Y	Tony, J. F. et al. "Characterization of Two Novel Ly-6 Genes" J. Immunol. (1993) 第150巻 第12号 p. 5379-5390	1-16
Y	Suzan, F. et al. "Analysis of three distinct Ly6-A-related cDNA sequences isolated from rat kidney" Immunogenetics (1990) 第31巻 第2号 p. 104-111	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.99

国際調査報告の発送日

14.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-48696, A (東レ株式会社) 1. 3月. 1991 (01. 03. 91) (ファミリーなし)	1-16
Y	T. Graubert et al. "Characterization of the murine and human Ly-6 gene clusters" Blood (1997) 第90巻 第1part2号 p. 145B	1-16 -
Y	M. Nosten-Bertrand et al. "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1" Nature (1996) 第379巻 p. 826-829	1-16
Y	Thomas, P. et al. "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules" Immunol. Cell. Biol. (1995) 第73巻 第4号 p. 277-296	1-16

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲17-19は、ヒトを治療する方法に係る発明であるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)